UNIVERSITY OF HAWAII
LIBRARY

EXPERIENTIA

REVUE MENSUELLE DES SCIENCES PURES ET APPLIQUÉES
MONATSSCHRIFT FÜR DAS GESAMTE GEBIET DER NATURWISSENSCHAFT
RIVISTA MENSILE DI SCIENZE PURE E APPLICATE
MONTHLY JOURNAL OF PURE AND APPLIED SCIENCE

Editores:
R. MATTHEY · A. v. MURALT · L. RUZICKA · J. WEIGLE
Lausanne Bern Zürich Genève-Pasadena
Redactor: H. MISLIN, Basel

VERLAG BIRKHÄUSER AG. · BASEL 10
SUISSE — SCHWEIZ — SVIZZERA — SWITZERLAND

Vol. VIII. – Fasc. 11 15. XI. 1952 Fr. 3.–

SOMMAIRE - INHALT - SOMMARIO - CONTENTS

Kurt H. Meyer †: The Past and Present of Starch Chemistry 405

Brèves communications - Kurze Mitteilungen - Brevi comunicazioni - Brief Reports

H. Guggenheimer: Über vierdimensionale Einsteinräume 420
G. Cilento: Expanded Valence Shell of Sulfur in certain Thiolesters 421
F. W. Kahnt, Ch. Meystre, R. Neher, E. Vischer und A. Wettstein: Biologische Hydroxylierungen von Steroïden 422
M. Zimmermann: Über ein neues Trisaccharid 424
R. A. Boissonnas and S. Lo Bianco: A New Method for Qualitative and Quantitative Study of Aminoaciduria by Paper Chromatography 425
P. Lacroix: Autoradiographies du tissu osseux spongieux 426
L. Mandel, M. Jacob et P. Mandel: Action de la thyroxine, du propylthiouracile et de la thyroïdectomie sur les acides nucléiques de la rate 426
J. Roche, Nguyen-van Thoai et P. E. Glahn: Sur la L-aminoacideoxydase de nombreux invertébrés marins . . 428
F. G. Sherman: Inhibition of Fermentation by X-rays in Normal and Low Nitrogen Yeast 429
L. de Caro, C. Casella, and G. Rindi: Respiratory Quotient, Heat Production and Blood Pyruvic Acid in Aneurin Deficient Rats after Glucose Administration 431
H. Herken, M. Monnier, H. Coper und H. Laue: Hemmung subkortikal ausgelöster Krampfpotentiale durch β-Hexachlorcyclohexan 432
K. Bucher und M. Schär: Besonderheiten der Reaktion des Herzens bei ungleicher Belastung seiner beiden Hälften 434
P. Suomalainen and Elsie Petri: Histophysiology of the Pancreas in the Hibernating Hedgehog 435
P. Desaive, Z. Bacq et A. Herve: Causes de la stérilité des souris femelles irradiées *in toto* et protégées par la cystinamine 436
L. Gyermek: Methode zur biologischen Bestimmung des adrenokortikotropen Hormons (Pro Experimentis) . . . 438

Nouveaux livres - Buchbesprechungen - Recensioni - Reviews

Mathematics of Relativity. By G. Y. Rainich (John Wiley & Sons, Inc., New York, 1950) (Ref. K.-F. Moppert) . . . 439
Allgemeine und anorganische Chemie. Von A. Roedig (Hans-Ferdinand-Schulz-Verlag, Freiburg i. Br. 1948) (Ref. A. Ramel) 439
Handbuch der anorganischen präparativen Chemie. Herausgegeben von Georg Brauer (Verlag Ferdinand Enke, Stuttgart 1948) (Ref. R. Mangold) 439
Igneous and Metamorphic Petrology. By Francis J. Turner and Jean Verhoogen (McGraw-Hill Book Company, Inc., New York, 1951) (Ref. G. C. Amstutz) 440
Biological Application of Tracer Elements, Vol. XIII, *The Biological Laboratory* (Cold Spring Harbor, New York, 1948) (Ref. K. Bernhard) 440
E. Merck's Jahresbericht, 64. Jahrgang, 1950 (Verlag Chemie GmbH., Weinheim 1951) (Ref. G. Boehm) 441
Cell Growth and Cell Function. By T. O. Caspersson. (W. W. Norton & Co. Inc., New York, 1950) (Ref. H. Lüdin) 441
The Care and Breeding of Laboratory Animals. Edited by Edmond J. Farris (John Wiley & Sons, Inc., New York, and Chapman and Hall, London, 1950) (Ref. H. Querner) 441

Informations - Informationen - Informazioni - Notes

Explicationes: A. Goldstein: A Relationship between the Rate of Attaining Equilibrium and the Velocity Constant of the Reverse Reaction in certain Enzyme-Inhibitor Systems 442
Congressus – Constructiones 444

EXPERIENTIA

L'EXPERIENTIA publiera:

1. des *articles originaux* sur les récentes recherches scientifiques écrits dans une des langues principales;
2. de *brèves communications;*
3. informera ses lecteurs des événements marquants de la vie scientifique, donnera des *comptes rendus concernant les récentes publications, les congrès et les assemblées.*

Die EXPERIENTIA stellt sich die Aufgabe:

1. durch *zusammenfassende Originalartikel* in einer der wissenschaftlichen Hauptsprachen von Autoren aus verschiedenen Ländern über Forschungsergebnisse berichten zu lassen, die im Vordergrund des Interesses stehen;
2. kurze *Mitteilungen* aufzunehmen;
3. durch Besprechung neuerschienener *Bücher*, durch Referate über *Kongresse* und *Versammlungen* sowie durch andere Mitteilungen über die bedeutendsten Ereignisse des naturwissenschaftlichen Lebens zu informieren.

EXPERIENTIA si propone di pubblicare:

1. *articoli originali riassuntivi*, in una delle principali lingue usate dalla scienza, ad opera di autori di diversi paesi, su risultati scientifici di grande interesse;
2. *brevi comunicazioni;*
3. *recensioni di nuovi libri, relazioni di congressi e riunioni*, come pure altre comunicazioni su importanti avvenimenti nel campo delle scienze naturali.

The aim of EXPERIENTIA is:

1. to publish comprehensive articles embodying the results of recent scientific research. These will be written in one of the principal scientific languages and contributed by authors in various countries;
2. to publish *brief reports;*
3. to give information about the most important events in natura, science by means of *reviews of the latest books, reports on congresses and meetings*, as well as through other communications.

EXPER.

L'EXPERIENTIA paraît e 15 de chaque mois. Vente et abonnement dans toutes les librairies suisses et étrangères, ou directement chez l'éditeur. Prix du numéro fr. 3.–. Abonnement pour un an fr. 28.— pour la Suisse; pour l'étranger fr. 34.—. Ces prix s'entendent en francs suisses.

Adresser toute correspondance touchant la rédaction de l'EXPERIENTIA exclusivement à l'éditeur soussigné.

Dernier délai d'admission pour les manuscrits: 35 jours avant la parution, c'est-à-dire le 10 du mois pour le numéro du mois suivant.

Les auteurs recevront gratuitement, s'ils le désirent, 50 tirés à part de format 14,5 sur 21 cm, sans couverture. Pour le prix d'un nombre plus grand et pour la couverture s'adresser à l'éditeur. Les tirages à part doivent être commandés *avant* l'impression du périodique.

Prix pour les annonces: $^1/_1$ page fr. 220.— , $^1/_2$ page fr. 132.—, $^1/_4$ page fr. 77.—. Placements spéciaux: prix sur demande. Demandes à l'éditeur.

L'EXPERIENTIA est imprimée en Suisse.

Editions Birkhæuser S.A.. Bâle 10 (Suisse), Elisabethenstrasse 15
Tél. 49800; adresse télégraphique: Edita Bâle

Die EXPERIENTIA erscheint am 15. jedes Monats und kann im In- und Auslande durch jede Buchhandlung oder direkt vom Verlag bezogen werden. In Belgien, Dänemark, Deutschland, Finnland, Italien, Luxemburg, Marokko, Norwegen, Portugal, Schweden und Tschechoslowakei nehmen auch die Postämter Bestellungen entgegen.

Der Abonnementspreis beträgt in der Schweiz Fr. 28.—, im Ausland sFr. 34.—; die Einzelnummer kostet Fr. 3.–.

Alle Zuschriften an die Redaktion sind ausschließlich an den Verlag zu richten. Redaktionsschluß 35 Tage vor Erscheinungstermin, d.h. am 10. des Monats für den folgenden Monat.

Die Autoren erhalten auf Wunsch 50 Gratisseparata im Format 14,5 × 21 cm, ohne Umschlag. Die Kosten für weitere Separata und für Umschläge sind beim Verlag zu erfragen. Separata sind *vor* dem Druck der Zeitschrift zu bestellen.

Insertionspreise: $^1/_1$ Seite Fr. 220.—, $^1/_2$ Seite Fr. 132.— $^1/_4$ Seite Fr. 77.—; für Vorzugsseiten besondere Vereinbarung. Inseratenannahme durch den Verlag.

Die EXPERIENTIA wird in der Schweiz gedruckt.

Verlag Birkhäuser AG., Basel 10 (Schweiz), Elisabethenstraße 15
Tel. 49800; Telegrammadresse: Edita Basel

EXPERIENTIA esce a 15 di ogni mese e può esser richiesta ad ogni libreria svizzera o estera, o anche direttamente alla casa editrice. Il prezzo del singolo fascicolo è di fr. 3.–. L'abbonamento annuo è di fr. 28.— per la Svizzera; all'estero fr. 34.—. I prezzi vanno intesi in valuta svizzera.

Tutti gli invii alla redazione di EXPERIENTIA vanno indirizzati esclusivamente alla sottoindicata casa editrice.

La redazione di ogni fascicolo si chiude 35 giorni prima del termine di pubblicazione, cioè al 10 del mese, per il mese seguente.

Gli autori ricevono, su desiderio, 50 estratti del formato 14,5 × 21 cm, senza copertina. Il prezzo degli estratti in più e della copertina viene ndicato, su richiesta, dalla casa editrice. Gli estratti vanno ordinati *prima* della stampa della Rivista.

Prezzi per annunci: $^1/_1$ pag. fr. 220.—, $^1/_2$ pag. fr. 132.—, $^1/_4$ pag. fr. 77.—; per pagine speciali, accordi da stabilire. Gli annunci sono da inviare alla casa editrice.

EXPERIENTIA si stampa in Isvizzera.

Casa editrice Birkhæuser S.A., Basilea 10 (Svizzera), Elisabethenstr. 15
Tel. 49800; Indirizzo telegrammi: Edita Basilea

EXPERIENTIA is published on the 15th of every month and can be obtained in any country through the booksellers or from the publishers. The price per number is fr. 3.–, by annual subscription by inland-mail fr. 28.—; other countries fr. 34.—. Prices in Swiss currency.

All communications to the editors should be addressed to the publishers. All manuscripts for publication in a given number must be in the hands of the publishers on the 10th of the preceding month.

The authors receive, on request, 50 reprints 14,5 × 21 cm without cover free of charge. For the prices of additional reprints and covers, inquiries should be addressed to the publishers. Reprints must be ordered *before* the number is printed.

Prices for advertising: $^1/_1$ page fr. 220.—, $^1/_2$ page fr. 132.—, $^1/_4$ page fr. 77.—. Advertisements should be sent to the publishers.

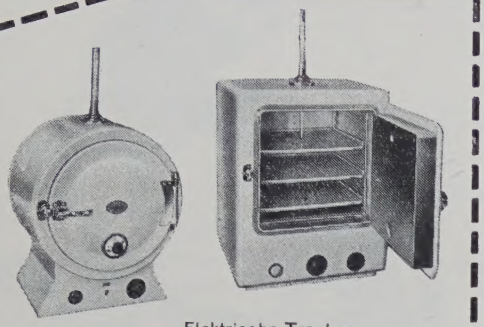
Published by Birkhäuser Ltd., Basle 10 (Switzerland), Elisabethenstr. 15
Phone 49800; Telegrams: Edita Basle

Printed in Switzerland / E. Birkhäuser & Cie., Basel

Verzeichnis der Inserenten – Liste des annonceurs – List of Advertisers – Experientia VIII/11

Biological Abstracts, Philadelphia
Verlag Birkhäuser AG., Basel
Verlag Chemie, GmbH., Stuttgart
CIBA AG., Basel
Cilag AG., Schaffhausen
Ganz & Co., Zürich
E. Mettler, Zürich
Salvis AG., Luzern
Verlag H. R. Sauerländer & Co., Aarau
Schwitter AG., Basel
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH., Stuttgart

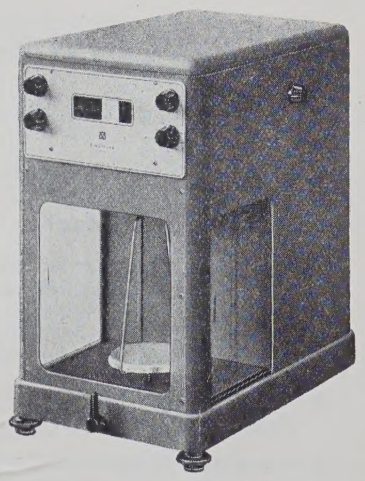
Elektrische Wärmegeräte
für Laboratorien



Elektrische Trocken-,
Brut- und Sterilisierschränke

Salvis

SALVIS AG. Luzern-Emmenbrücke
Fabrik elektrischer Apparate
Telefon (041) 2 61 16 / 2 61 17



Mit der **METTLER**-Analysenwaage
arbeiten Sie schneller, sicherer und genauer

Verlangen Sie Offerte
oder unverbindliche Demonstration
der verschiedenen Typen.

E. METTLER
Zürich 1

Fabrik für Analysenwaagen
Pelikanstrasse 19, Telephon 25 25 70

Vierte, neubearbeitete und erweiterte Auflage

DR. BRUNO LANGE

Kolorimetrische Analyse

unter Mitwirkung von *Prof. Dr. H. Hirschmüller* und *Dr. Karl Menzel*

1952. XXIII, 395 Seiten mit 104 Abbildungen und 18 Tabellen. Ganzleinen DM 23.80

Diese empfindliche und schnelle Analysen-Methode findet in steigendem Masse Anwendung in den wissenschaftlichen und technischen Laboratorien der Chemie und ihrer Grenzgebiete.

«Das Lebensmittel-Laboratorium» schreibt über die dritte Auflage des Buches:

«... Quantitative Bestimmungen, die oft viele Stunden in Anspruch nehmen, können mit Hilfe der Kolorimetrie oft in ebensoviel Sekunden ausgeführt werden. Wie das gemacht wird, ist in diesem Buche eingehend beschrieben, das in keinem Laboratorium fehlen sollte.»

Prospekt auf Wunsch

VERLAG CHEMIE, GmbH.

WEINHEIM/BERGSTRASSE Deutschland

Naturwissenschaftliche Rundschau

Herausgegeben von Dr. H.W. Frickhinger

Heft 10, Oktober 1952

Dr. Eduard Riehm, Berlin-Dahlem
Innere Therapie im Pflanzenschutz

Prof. Dr. H. von Philipsborn, Bonn
Neues über Calziumoxalat

Dr. M. Herman, Gent
Die Raman-Spektrographie

Dr. Eduard Huß, Friedrichshafen
Aerologie im Bodenseegebiet

Prof. Dr. Georg Maurer, München
Blutersatzmittel

Dr. Karel Jiřina, Prag
Über die Verwendung der Frösche zu wissenschaftlichen Zwecken

Werner Heybrock, Seelbach
Erdpyramiden im Kaukasus

Kurzberichte aus der Wissenschaft – Photographie und Naturwissenschaft – Wissenschaftliche Gesellschaften und Tagungen – Zeitschriftenschau – Buchbesprechungen – In memoriam – Gedenktage – Hochschulnachrichten

Monatlich erscheint ein Heft mit über 40 Seiten Umfang. Vierteljährlich DM 6.–. Einzelheft DM 2.20. Für Mitglieder der Gesellschaft Deutscher Naturforscher und Ärzte, sowie für Studenten und Assistenten in nicht vollbezahlter Stellung vierteljährlich DM 4.80. Lieferung durch jede Buchhandlung im In- und Ausland, durch die Post oder direkt vom Verlag.

In den Ländern Dänemark, Italien, Luxemburg, Norwegen, Portugal, Schweden und der Schweiz ist der Bezug durch die Post möglich.

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft

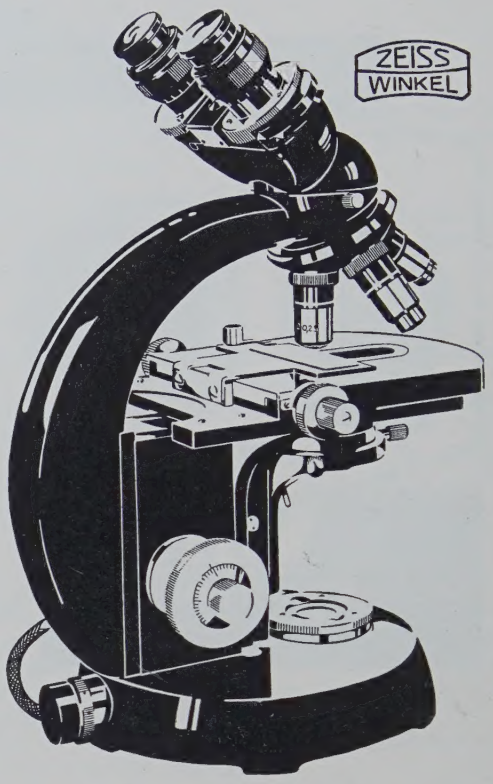
Stuttgart 1, Postfach 40

*

NEUES **ZEISS**-WINKEL STANDARD-MIKROSKOP GF 525

Das Ergebnis einer hundertjährigen Tradition !

- **Lichtstarke Einbaubeleuchtung (Köhlersches Prinzip) für subjektive Beobachtung und Mikrophotographie**
- **Tiefliegende, koaxial gelagerte Triebknöpfe für Grob- und Feineinstellung**
- **Grosser Kreuztisch mit koaxial gelagerten, links- und rechtsseitig angebrachten Triebknöpfen**
- **Vollkommener Präparatschutz durch gefederte Fassung der Objektive**
- **Vergrösserungswechsler für die Okulare (ohne Okularwechsel)**
- **Vereinigter Hellfeld-Phasenkontrast-Dunkelfeld-Kondensor**
- **Neue Achromate und Neofluare mit dezimalgeometrischer Abstufung der Vergrösserungen**



Auskunft und Vorführung durch die Generalvertretung für die Schweiz:

GANZ & Co
BAHNHOFSTR. 40
TEL. (051) 23 97 73
Zürich

Naturwissenschaftliche Rundschau

Herausgegeben von Dr. H.W. Frickhinger

Heft 9, September 1952

Prof. Dr. Walther Fischer, Jena
Zur Bedeutung der Gesellschaft Deutscher Naturforscher und Ärzte

Prof. Dr. Paul Walden, Tübingen
Die moderne Chemie und der alte Stein der Weisen

Prof. Dr. Alexander von Muralt, Bern
Alte und neue Theorien der Nervenerregung

Prof. Dr. Fritz Gassmann, Zürich
Ein Überblick über die Geophysik

Prof. Dr. Karl Sueßenguth, München
Über den derzeitigen Stand der Angiospermen-Systematik

Dr. Heinz Brüll, Hamburg
Über die Abstammung physiologischer Rhythmen auf das Fortpflanzungsverhalten des Sperbers

Dr. Fritz Mutschke, Stuttgart
Wissenschaftliche Farbenphotographie

Dr. Richard Bochalli, Melsungen
Zum 50. Todestag Rudolf Virchows

Kurzberichte – Photographie und Naturwissenschaft – Wissenschaftliche Gesellschaften und Tagungen – Zeitschriftenschau – Buchbesprechungen – In memoriam – Gedenktage – Hochschulnachrichten

Monatlich erscheint ein Heft mit über 40 Seiten Umfang. Vierteljährlich DM 6.–. Einzelheft DM 2.20. Für Mitglieder der Gesellschaft Deutscher Naturforscher und Ärzte, sowie für Studenten und Assistenten in nicht vollbezahlter Stellung vierteljährlich DM 4.80. Lieferung durch jede Buchhandlung im In- und Ausland, durch die Post oder direkt vom Verlag.

In den Ländern Dänemark, Italien, Luxemburg, Norwegen, Portugal, Schweden und der Schweiz ist der Bezug durch die Post möglich.

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft
Stuttgart 1, Postfach 40

E. G. ROCHOW

Einführung in die Chemie der Silikone

Nach der 2. amerikanischen Auflage ins Deutsche übertragen von *Prof. Dr. H. Stamm*

1952. 221 Seiten mit 6 Abbildungen im Text und 8 Tafeln. Ganzleinen DM 21.80

Diese neuartigen synthetischen Stoffe mit ihren auffallenden Eigenschaften erobern sich immer mehr technische Anwendungsgebiete, z. B. als Öle, als Kunstharze, als gummiartige Massen. In den Handbüchern der Chemie werden die Silikone zumeist noch nicht behandelt. Daher wird die vorliegende Übersetzung dieser Monographie besonders begrüsst werden.

Die Fachzeitschrift «Gummi und Asbest» urteilt:

«... sehr beeindruckt von der erschöpfenden, meisterhaften Darstellungsweise, den hervorragenden Bildbeigaben und den reichlich angezogenen Literaturstellen (518) ... Das Buch wird sehr bald für Forschung und Praxis zu einem unentbehrlichen Handwerkszeug werden.»

Ausführlicher Prospekt auf Wunsch

VERLAG CHEMIE, GmbH.
WEINHEIM/BERGSTRASSE Deutschland

EXPERIENTIA

Vol. VIII - Fasc. 11 Pag. 405–444 15. XI. 1952

The Past and Present of Starch Chemistry

By KURT H. MEYER †[1], Geneva

Editorial Remark:–On April 14, 1952, our esteemed coworker, Professor K. H. MEYER, died of a very severe illness. He was just able to finish his last paper. He had intended to publish it in *Experientia*, a journal in which he had published frequently. He was always on the best of terms with our editorial staff. Our readers will welcome this survey *in memoriam* to this well-known and respected scientist. H. M.

Introduction

As early as 1811 KIRCHHOFF[2] discovered that grape sugar is produced when starch is treated with acids. Some years later[3] he observed that wheat gluten, or its aqueous extract, converts potato-starch paste into another sugar and he concluded that a starch-sugar transformation is a necessary step in the alcoholic fermentation of amylaceous material. In 1831 LEUCHS[4] noted that saliva brings about the liquefaction of starch, with simultaneous production of a sugar. Two years later PAYEN and PERSOZ[5] obtained from malt a solid amorphous substance which also produced sugar from starch and which they called diastase. These investigations mark the beginning of the structural chemistry of starch; they also mark the birth of a new branch of biochemistry, namely enzymology.

Degradation by amylases, as diastases (i.e. starch splitting enzymes) are now called, has always served as a tool in starch chemistry. The synthesis and degradation of starch play an outstanding role in the biochemistry of plants. In addition, starch is a principal human foodstuff; it is degraded in the body by specific enzymes. Starch is the primary material in the beer and alcohol industries where it is submitted to diastatic breakdown. It is not surprising, therefore, that many botanists, chemists, technologists, and enzymologists have worked on starch and its degradation. By 1930 the number of publications in this field amounted to more than 4000[1].

However, the result of all this research was not satisfactory; it was pointed out in 1930 by the french biochemist SCHOEN[2], that "... in spite of the enormous number of investigations, the study of starch is far from being completed. All investigators agree on this point. It is, in fact, the only point on which there is general agreement in this most controversial aspect of biological chemistry; all other observations are hotly disputed. The origin, constitution, and structure of starch are matter for discussion and there is no unanimity over the way in which it is disaggregated during hydrolysis. Most serious of all, it is not yet known whether or not starch is a single chemical compound."

During recent years, however, most of these questions have been answered. We established in 1940 that most starches contain as principal constituents two polysaccharides, or rather types of polysaccharide, the structures of which are essentially different[3]. They are:

(1) an unbranched polysaccharide, or mixture of unbranched polysaccharides (now known as amylose), in which from 100 to 2000 anhydro-glucose units are joined together by α–1:4 (maltose) bonds to form chains of various lengths (Fig. 1),

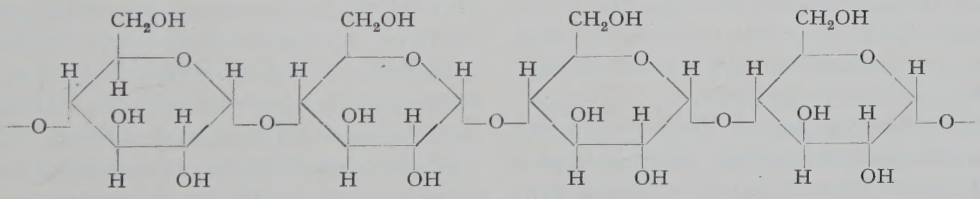


Fig. 1. Amylose.

(2) a highly branched polysaccharide (now termed amylopectin), in which the branches are joined to the

[1] Laboratory of organic and inorganic Chemistry, University of Geneva.

[2] G. C. S. KIRCHHOF, Mém. Acad. imp. Sci. St. Petersburg *4*, 27 (1811).

[3] G. C. S. KIRCHHOF, Schweigger's J.Chem. Phys., Nuremberg *14*, 389 (1815).

[4] E. LEUCHS, Poggendorf's Ann. Phys. Chem. *22*, 623 (1831).

[5] A. PAYEN and J. PERSOZ, Ann. Chim. Phys. *53*, 73 (1833).

[1] R. P. WALTON, *A Comprehensive Survey of Starch Chemistry* (Chemical Catalog Co., New York, 1928).

[2] M. SCHOEN, Bul. Soc. Chim. biol. *12*, 1033 (1930).

[3] K. H. MEYER, Naturwissenschaften *28*, 397 (1940); Advan. Coll. Sci. *1*, 143 (1942).

main chains by α–1:6 (isomaltose) bonds the main chains and branches being structurally the same as amylose (Figs. 2 and 3).

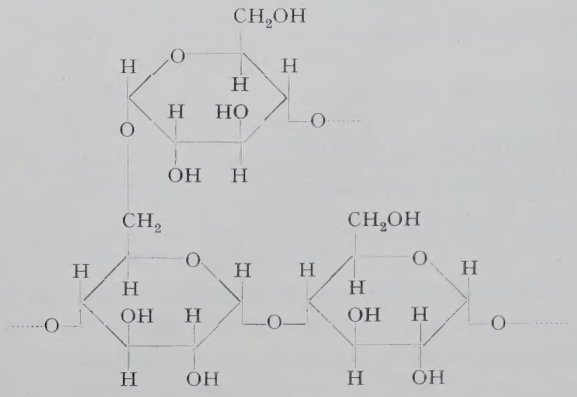


Fig. 2.

In contrast, the starches from corn, rice, and millet, that are stained purple by iodine and are called glutinous or waxy starches, are homogeneous; they contain only the branched polysaccharide[1]. From 1946 on, the isolation of various pure crystalline amylases has brought about remarkable progress in our understanding of the enzymology of starch breakdown. Furthermore we have to-day a well founded insight into the submicroscopic structure of the starch granule.

It seems therefore that research in this field has now advanced to a point where it would be of great interest to consider the evolution of starch chemistry from its very origin. Before surveying our present knowledge of the subject, we shall recapitulate some of the older results of botanists, colloid-scientists, organic chemists, and enzymologists, treating them separately. Such a procedure is justifiable because, until recent times, research on starch in these different branches of science has not been coordinated, and this partly accounts for the astounding fact that the structure of starch was established much later than those of numerous alkaloids, vitamins, and hormones whose constitutions were determined soon after their discovery.

(1) *The Botanist's Contribution.*–Many leading botanists have worked with starches. Their extensive microscopical studies showed that the granules from various plants are so characteristically differentiated in size and shape that one can determine the origin of a starch by microscopy[2]. Nevertheless, all types of starch granule are composed of layers and all exhibit a black cross when viewed in polarised light. This cross is typical of spherulites which are spherical aggregates of radially oriented needle-like crystals. The individual crystals are not, however, visible under the microscope; hence NAEGELI[1] concluded that they are submicroscopic and he called them "crystalline micelles". MEYER[2], who continued this work, thought that the crystallites might be branched and called them "trichite", but only recently has a clear understanding been reached of their nature and function (cf. section 7).

Botanists have also contributed to the chemistry of starch. As early as 1712 LEEUWENHOEK[3] supposed the granules to possess a resistant shell different from the water-soluble interior. NAEGELI confirmed the older observation of PAYEN and PERSOZ that malt degrades only part of the granule, the "shell" remaining intact. Hence, and also because the malt-treated shells did not give a blue colour with iodine, NAEGELI concluded that the shells are chemically different from the contents and are made of a cellulose-like substance (amylocellulose). MOHL[4], MUSCULUS[5], MEYER and DE VRIES[6] showed, however, that the shells can be dissolved in alkali and not only remain in solution after neutralisation but also stain with iodine. Subsequently the polysaccharide is slowly deposited from solution. It is now realised that the shell is composed of a difficultly soluble aggregate comprising a mixture of high molecular-weight linear and branched polysaccharides which may be brought into super-saturated solution by dissolving in alkali and neutralising. At the time the above mentioned botanists assumed that there are various starch components present in the form of different aggregates of the same basic substance. This was termed "amylose" by MEYER, the insoluble aggregate being distinguished as α- and the soluble form as β-amylose. FREY-WYSSLING[7] and ALSBERG[8] also thought that the fractions "amylose" and "amylopectin", which are to be discussed later and are synonymous with MEYER's β- and α-amylose, might be fractions of different molecular weight of the same basic substance. HANES[9], whose important work on the phosphorolysis of starch will be referred to later, also advocated this conception, as did BADENHUIZEN[10] who published in 1938 under the characteristic title, *The Starch Granule as a Chemically Homogeneous Entity.*

(2) *The Colloid Chemist's Contribution.*—It was found by technologists[11] as well as botanists that under normal

[1] K. H. MEYER and M. FULD, Helv. chim. Acta *24*, 1404 (1941) (glutinous rice). – K. H. MEYER and M. HEINRICH, Helv. chim. Acta *25*, 1639 (1942) (waxy maize).

[2] E. T. REICHERT, *The Differentiation and Specificity of Starches in Relation to Genera, Species, etc.*, Washington, Carnegie Publ. No. 173 (1913).

[3] A. LEEUWENHOEK, Epistolae *26* (1719).

[4] H. MOHL, Bot. Ztg. *17*, 225 (1859).

[5] F. MUSCULUS, Bot. Ztg. *37*, 345 (1879).

[6] H. DE VRIES, Rec. Trav. chim. Pays-Bas *4*, 187 (1885).

[7] A. FREY-WYSSLING, *Submicroskopische Morphologie des Protoplasmas* (Berlin, 1938), p. 277.

[8] C. ALSBERG, Plant Physiol. *13*, 295 (1938).

[9] S. HANES, New Phytologist *36*, 101, 189 (1937).

[10] N. P. BADENHUIZEN, Rec. Trav. bot. nederl. *35*, 561 (1938).

[11] O'SULLIVAN, J. Chem. Soc. *35*, 770 (1879). – H. T. BROWN and J. HERON, J. Chem. Soc. (London) *35*, 596 (1879).

conditions starch pastes yield only about 80% of fermentable sugars on degradation. MAQUENNE and ROUX[1] concluded that starch contains 20% of a resistant substance that remains unchanged after fermentation of the sugars, does not stain with iodine, and is akin to the pectins and plant mucilages. This substance they called "amylopectin". The part of the starch that is degraded to maltose and stains iodine was termed "amylose". These views were widely criticised, and vigorously condemned by SCHOEN[2]. It appears that MAQUENNE and ROUX did not even consider the possibility that a polysaccharide might be only partially attacked;—but this is in fact the case! We now know that both the common heterogeneous starches and the homogeneous glutinous types are rapidly degraded only to 80%, and that the residue consists of oligosaccharides, tetraoses, and trioses which are unfermentable and difficult to hydrolyse. It is incorrect, therefore, to ascribe the discovery of the heterogeneous nature of starch to MAQUENNE and ROUX. Nevertheless we see how the expressions "amylose" and "amylopectin" originated, although they have been generally employed in other senses.

Most authors have identified the resistant material of the shell as "amylopectin" and the readily soluble contents as "amylose". Many methods have been suggested for the separation of the two substances: treatment of starch with concentrated caustic soda and precipitation of the amylopectin with alcohol[3]; extraction of amylose with warm water[4]; precipitation of amylopectin from dilute pastes with calcium chloride[5]; freezing and thawing of pastes, when the amylopectin remains as a fibrous mass[6]; and separation of "amylopectin" from pastes by centrifuging[7]. Several authors isolated the "amylopectin" alone by treatment of the starch with diastase. They seem to have given as little attention as MAQUENNE and ROUX to the possibility that amylopectin itself might be attacked. Constitutional differences between the fractions have been repeatedly sought; but neither HIRST[8] nor KARRER[7] could find any, and HAWORTH[9] subsequently defined degraded starch as "amylose". We have recently established that the "amylopectins" obtained by the above methods are high molecular-weight mixtures of both linear and branched starch polymers while the "amyloses" are simply mixtures of lower molecular-weight.

[1] L. MAQUENNE and E. ROUX, Ann. Chim. Phys. *9*, 179 (1906).
[2] M. SCHOEN, Bul. Soc. Chim. Biol. *12*, 1033 (1930).
[3] Z. GATIN-GRUZEWSKA, C. r. Acad. Sci. *146*, 540 (1908); Z. Physiol. Path. Gen. *14*, 7 (1912). – F. BOTTAZI and C. VICTOROV, Real Acad. Linc. Chim. Phys. (Roma) *19*, (5) 7 (1910).
[4] C. TANRET, C. r. Acad. Sci. *158*, 1353 (1914).
[5] J. T. L. ZWIKKER, Rec. Trav. Bot. neder. *18*, 78 (1921).
[6] A. R. LING and D. R. NANJI, J. Chem. Soc. (London) *123*, 2666 (1923).
[7] P. KARRER and P. KRAUS, Helv. chim. Acta *12*, 1144 (1929).
[8] E. L. HIRST, M. PLANT, and M. D. WILKINSON, J. Chem. Soc. *1932*, 2375.
[9] D. K. BAIRD, W. N. HAWORTH, and E. L. HIRST, J. Chem. Soc. *1935*, 1201.

The electro-decantation of starch leads to other results. This method is due to SAMEC[1], who has devoted his life to the investigation of starch. At the anode "amylopectin" is deposited, this we have found to contain the greater part of the branched polysaccharide. In solution there remains what SAMEC called "amylo-amylose" and which appears to be the unbranched carbohydrate. SAMEC himself established that amylo-amylose stains an intense blue colour with iodine and is wholly degraded to maltose by barley amylase (β-amylase) while the "amylopectin" stains violet red and is degraded only to the extent of 60%[2]. On the basis of these important, but little noticed, results SAMEL concluded that there is a constitutional difference between the two polysaccharides, but left the question of their nature to the organic chemists, observing that: "... the answer will not be long hidden from modern organic research"[3].

Independently of SAMEC we were studying the systematic fractionation of starch from 1935 onwards. We found that on careful treatment of the granules with water at, or about, 60°C a polysaccharide goes into solution. This substance is differentiated from the principal, branched, polysaccharide by its intense blue iodine compound and also by the fact that its triacetate can form strong threads, comparable with those from cellulose[4]. We decided therefore on an unbranched structure similar to that of cellulose and we were shortly able to confirm this structure by chemical methods[5]. Our product was completely degraded by β-amylase in the same manner as SAMEC's amylo-amylose. Thus the question mentioned above was answered even before it had been posed.

Neither SAMEC's nor our fractionation method is perfect; with both, one is left with a mixture of branched and linear polysaccharides. It is not therefore surprising that STAMBERG[6] found on electrodialysis only 20% "amylopectin" and 80% "amylose" in wheat starch although the branched polysaccharide does in fact comprise 80% of the whole. Furthermore, FREUDENBERG[7] could find no constitutional difference between the "amylo-amylose" and "amylopectin" prepared by SAMEC's method, and earlier workers had no success with the method used in our laboratory. The best method of fractionation is that discovered by SCHOCH[8]. Addition of butanol to a pressure-cooked starch paste causes a polysaccharide-alcohol complex (SCHOCH's "A" fraction) to separate, and this poly-

[1] M. SAMEC, *Kolloidchemie der Stärke* (Verlag Th. Steinkopf, Leipzig, 1927).
[2] M. SAMEC and E. WALDSCHMIDT-LEITZ, Z. Physiol. Chem. *203*, 16 (1931).
[3] M. SAMEC, Ber. dtsch. chem. Ges. [A] *73*, 85 (1940).
[4] K. H. MEYER, C. r. Soc. Phys. Hist. Nat. Genève *57*, 19 (1940).
[5] K. H. MEYER, Naturwissenschaften *28*, 397 (1940).
[6] E. O. STAMBERG, Cereal Chem. *17*, 342 (1941).
[7] K. FREUDENBERG and H. BOPPEL, Ber. dtsch. chem. Ges. *71*, 2505 (1938).
[8] T. J. SCHOCH, Cereal Chem. *18*, 121 (1941).

saccharide was later found to be the pure linear component[1]. Substantially pure branched component remains in solution.

Colloid chemists have made intensive investigations on the problem of the structure of "pastes"—those remarkable viscous systems which are formed on heating starch in water. After long investigation SAMEC[2] came to believe that the properties of starch pastes and solutions are essentially determined by the small quantities of non-saccharide impurities. The phosphorus content of the paste-forming amylopectin appeared to him of especial importance since the non paste-forming "amylo-amylose" is free from phosphorus. MALFITANO[3] also considered the phosphorus content of first importance. According to him, starch is an aggregate of individual complexes each of which is centred around a phosphorus atom—almost as in the heteropolyacids, such as phosphotungstic acid. However, POSTERNAK[4] has now shown that in cereal starches the phosphorus is not combined with the polysaccharide but exists as phosphatide in the accompanying fats. Since both the original and de-fatted starches yield identical pastes, both SAMEC's and MALFITANO's ideas must be incorrect.

A "colloid chemical" theory which also completely ignored the chemical constitution of starch was proposed by VON DER HOEVE, BUNGENBERG DE JONG, and KRUYT[5]. According to these authors, the grain is built up of negatively charged micelles that are held together at various places by means of a water layer in which the water is in an "abnormal state". The force exerted by the swelling granules was accounted for by capillary-electric repulsive forces between the likecharged micelles. However, granules from which the ionised phosphatide groups have been removed swell quite as well as native granules, and hence electrical forces can play no role in swelling phenomena.

We shall see later (Section 8) that the chemical constitution of the polysaccharide as well as the submicroscopic structure of the granules must be considered in any attempt to elucidate the mechanism of paste formation.

(3) *The Organic Chemist's Contribution.*—As early as 1814 KIRCHHOFF[6] discovered that the sugar obtained from starch by the action of malt can be crystallized from alcohol and is different from the glucose obtained on acid-hydrolysis. DUBRUNFAUT[7] again isolated the sugar in 1847 and called it "maltose". This work was also overlooked and the re-discovery is due to O'SULLIVAN[8]. The constitutions of both sugars have been unequivocally established by the outstanding work of HAWORTH[1].

Since maltose, produced by the degradation of starch, is composed of two glucose residues connected by an α–1:4 glucosidic link, it was generally believed up to 1920 that there exists in starch a high molecular-weight polysaccharide whose glucose residues are joined solely by maltose-type bonds. This viewpoint was advocated for example in the wellknown text-book of V. MEYER and P. JACOBSON[2].

In 1920 commenced a strange phase of the chemistry of the natural polymers–rubber, cellulose, silk, and starch. Molecular-weight determinations by freezing-point depression gave strikingly low values, and hence originated the theory that these substances are composed of low molecular-weight units that associate to form larger entities through special bonding forces. As primary unit of the various types of starch, including so-called soluble starch, the following were suggested: an anhydro-trisaccharide[3]; a tri-hexosan for the insoluble outer layer and a di-hexosan for the soluble contents[4]; a maltose anhydride[5]; a cyclic anhydride of malto-triose[6]; and a cyclic hexaose anhydride[7]. In all cases it was further asserted that there are no free aldehyde groups in starch. This however is to be attributed to the shortcomings of the analytical methods. Hence the discovery of a method that could detect very small reducing powers represented a big step forward, and it was in fact found that all starches exhibit reducing power[8].

By the following method HAWORTH[9] arrived at the concept of a "molecule" of 20 glucose residues. All free hydroxyl groups were first methylated and the product acid-hydrolyzed, the resulting sugar mixture was then analyzed. The mixture yielded 5% tetra-methylglucose which could only have originated from the non-aldehydic end groups. There is therefore one end-unit for each twenty glucose units; "... this corresponds to a chain which is not endless or to a molecular weight of not more than 4000". These fragments of about 20 residues were also known as repeating units; they were supposed to aggregate through bonds of unspecified type to form the various kinds of starch.

According to HAWORTH, "amylopectin" can be disaggregated to "amylose" and then be re-formed on standing[10].

[1] K. H. MEYER *et al.*, J. Phys. Coll. Chem. *53*, 319 (1949).
[2] M. SAMEC and M. BLINC, Koll. Beih. *47*, 317 (1938).
[3] G. MALFITANO, Koll.-Z. *46*, 3 (1928).
[4] T. POSTERNAK, Helv. chim. Acta *18*, 1351 (1935).
[5] A. V. D. HOEVE, H. G. B. DE JONG, and H. R. KRUYT, Koll. Beih. *39*, 105 (1934).
[6] G. C. S. KIRCHHOFF, Schweigger's J. F. Chem. Phys. Nuremberg *14*, 389 (1815).
[7] A. DUBRUNFAUT, Ann. Chim. *21*, 178 (1847).
[8] C. O'SULLIVAN, J. Chem. Soc. *25*, 579 (1872).

[1] W. N. HAWORTH, Helv. chim. Acta *11*, 534 (1928).
[2] V. MEYER and P. JACOBSON, *Lehrbuch der Organischen Chemie*, Vol. I, part 2, 2nd Ed. (Verlag de Gruyter, Berlin, 1913), p. 1024 et seq.
[3] A. PICTET *et al.*, Helv. chim. Acta *7*, 934 (1924); *12*, 700 (1929); *10*, 276 (1927).
[4] H. PRINGSHEIM, *Die Polysaccharide*, 3rd Ed. (Berlin, 1931).
[5] P. KARRER, *Polymere Kohlenhydrate* (Leipzig, 1925).
[6] J. C. IRVINE and J. MACDONALD, J. Chem. Soc. *1926*, 1502.
[7] A. R. LING and D. R. NARJI, J. Chem. Soc. *123*, 2666 (1923); *127*, 629 (1925).
[8] W. A. RICHARDSON, R. S. HIGGINBOTHAM, and F. D. FARROW, J. Text. Inst. *37*, 131 (1936).
[9] W. N. HAWORTH, Nature *129*, 365 (1932).
[10] W. N. HAWORTH, Chem. and Ind. *53*, 1059 (1934).

Despite these association theories KUHN[1] and FREUDENBERG[2], as well as MEYER[3], continued to advocate the high molecular-weight nature of starch. It was shown that practically all the bonds in starch are hydrolyzed by acids at the same rate and must be glucosidic. MEYER also observed that an unbranched chain of maltose residues could never account for the properties of starch, whose molecules must be highly branched or cross-linked.

The theory of the branched structure of starch was taken up by STAUDINGER[4]. HAWORTH's end-groups became the ends of branches (not of molecules), an interpretation with which HAWORTH and his school concurred. STAUDINGER even proposed a special constitution viz. a main chain to which long branches are attached at intervals. Today this form is outdated, and the same can be said of HAWORTH's "laminated" structure, both ideas being in contradiction with the evidence from enzymic degradation.

Difficulties have also arisen because many chemists have treated "starch" as a homogeneous chemical substance, and occasionally still do, in disregard of other work. Such a conception is misleading. Starch granules are individual systems of biological origin; their properties vary with the species of plant, the organ in which they are found, their age, and their pretreatment. Many errors must be attributed to the fact that unfractionated starch or commercial degraded "soluble" starches have been used for structural research work.

In the earliest chemical investigations the question of heterogeneity was not raised. Subsequently KARRER[5], HIRST[6], and FREUDENBERG[7] were among the first to investigate the fractions, "amylose" and "amylopectin", obtained from pastes by centrifuging, electro-decantation, and freezing. They found no constitutional variation, and hence their "fractions" must now be considered to have been mixtures of the linear and branched polysaccharides. FREUDENBERG, like HAWORTH, concluded from his experiments that "amylose" and "amylopectin" differ only in their molecular-weight. Right until 1939 HASSID[8], HAWORTH[9], and HIRST[10] were emphasizing the constitutional homogeneity of what we now know to be the heterogeneous composite starches of Canna, wheat, horse chestnut, and rice. No difference was observed by these authors between the really homogeneous starch from maize and the common heterogeneous starches although quite different colours are given by these substances with iodine (respectively, purple and blue).

REICH and DAMANSKI[1] also defended a theory of homogeneity which was based on a primary substance containing only two free acetylable hydroxyl groups. "Amylose", containing three free hydroxyls, is obtained on hydrolysis. It can easily be shown that these authors acetylated imperfectly in a heterogeneous system, so that their conclusions are unsound. In their work on the periodate oxidation of starch, JACKSON and HUDSON[2] also treated it as a homogeneous substance.

In connection with our fractionation experiments by aqueous extraction of swollen granules we examined the soluble fraction and found it to contain 0·4% non-reducing end groups—one per 250 glucose units. Since the osmotically determined D.P. (degree of polymerization) was also 250 it follows that the molecules of this fraction are unbranched. Nevertheless, the main component of the starch consists of a highly branched polysaccharide of high molecular-weight as is proven by its high yield of tetra- and di-methyl glucoses on methylation and hence its heterogeneity was proven beyond doubt[3]. To end the prevailing confusion in the literature we proposed to re-define the old terms "amylose" and "amylopectin" in the following manner: the unbranched constituent would be called amylose, and the branched constituent, amylopectin.

This proposal was accepted by the Nomenclature Committee of the International Union of Chemistry.

(4) *The Enzymologist's Contribution.*—The story of the chemistry of the amylases, as are now denoted the starch-destroying diastatic enzymes, is not less eventful than that of starch. Early investigators soon established that sugars and dextrins are produced during liquefaction of starch by malt extract. KIRCHHOFF knew in 1815 that malt sugar is different from glucose[4], though this was twice forgotten and twice re-discovered—by DUBRUNFAUT[5] in 1847 and O'SULLIVAN[6] in 1872. The latter also established that, for equal extents of hydrolysis, the rotatory power of the starch solution falls much more at lower temperatures than at higher.

SCHWARZER[7] demonstrated that whereas the maltose producing capacity of aqueous malt extract is greatly diminished on heating, the dextrinizing power remains constant. Hence it was deduced by MÄRCKER[8] in 1877 that malt extract contains two enzymes. This was

[1] R. KUHN, Ann. Chem. *443*, 1 (1925).
[2] K. FREUDENBERG *et al.*, Ber. dtsch. chem. Ges. *63*, 1510 (1930).
[3] K. H. MEYER, H. HOPF, and H. MARK, Ber. dtsch. chem. Ges. *62*, 1103 (1929).
[4] H. STAUDINGER and E. HUSEMANN, Ann. Chem. *527*, 195 (1937).
[5] P. KARRER and E. v. KRAUSS, Helv. chim. Acta *12*, 1144 (1929).
[6] E. L. HIRST, M. PLANT, and M. D. WILKINSON, J. Chem. Soc. *1932*, 2375.
[7] K. FREUDENBERG and H. BOPPEL, Ber. dtsch. chem. Ges. *71*, 2505 (1938).
[8] W. Z. HASSID and W. H. DORE, J. Amer. Chem. Soc. *59*, 1503 (1937).
[9] W. N. HAWORTH, E. L. HIRST, and M. P. WOOLGAR, J. Chem. Soc. 177 (1935).
[10] E. L. HIRST and J. T. YOUNG, J. Chem. Soc. *1939*, 951, 1471.

[1] W. S. REICH and A. F. DAMANSKI, Bl. Soc. Chim. Biol. *19*, 158, 357 (1937).
[2] E. L. JACKSON and C. S. HUDSON, J. Amer. Chem. Soc. *59*, 2049 (1937).
[3] K. H. MEYER, Naturwissenschaften *28*, 397 (1940); Adv. Coll. Sci. *1*, 143 (1943).
[4] G. C. S. KIRCHHOFF, Schweigger's J. Chem. Phys. *14*, 389 (1815).
[5] A. DUBRUNFAUT, Ann. Chim. Phys. *21*, 178 (1847).
[6] C. O'SULLIVAN, J. Chem. Soc. *25*, 579 (1872); *30*, 125 (1876).
[7] A. SCHWARZER, J. prakt. Chemie *109*, 212 (1870).
[8] M. MÄRCKER, Ber. dtsch. chem. Ges. *10*, 2234 (1877).

proven by WIJSMAN[1] in 1889 by a striking and original demonstration in which he separated the two enzymes by their different rates of diffusion. A drop of malt extract was placed on a starch-containing gelatin plate which was sprayed after an interval with an iodine-potassium iodide solution. Where the extract had been placed there was now a colourless spot surrounded by a red-violet ring; the former indicated the presence of "dextrinogen amylase", the latter the "saccharifying amylase". Outside this ring the plate was stained blue because the starch was unchanged.

The rapidly diffusing enzyme changes starch into maltose and a limit dextrin that stains red-violet with iodine; this dextrin was also known as erythrogranulose. Dextrins giving no colour with iodine are produced by the slower diffusing enzyme. This work lays unnoticed for many years and it was not until much later that the remarkable behaviour of the optical rotation during degradation and the reaction mechanisms of the two kinds of enzymic action were clarified. The malt dextrinizing amylase and all animal amylases liberate maltose in the upward rotating α-form, the saccharifying amylase liberates it in the β-form. Consequently the two classes of amylase are referred to as α- and β-amylases[2]. The α-amylase acts at random so that the polysaccharide is split into large fragments. The β-amylase acts only from the non-reducing chain end, splitting off one maltose unit after another[3] (Fig. 4).

SAMEC and WALDSCHMIDT-LEITZ[4] found that SAMEC's "amyloamylose" is quantitatively degraded to maltose by β-amylase. The principal component of starch, however, is changed into a high molecular weight limit dextrin, and MYRBÄCK[5] and HANES put forward the idea that in this case the enzyme is hindered from acting further by foreign groups such as phosphate. We now know that the hindrances are in fact formed by the branch points.

Degradation by α-amylase is more complicated than that by β-amylase and the mechanism was only recently explained. A correlation between dextrinizing action and liquefying power was recognised quite early. Originally however no reducing groups could be detected in the first stages of liquefaction and in consequence a special liquefying or depolymerizing enzyme, without hydrolyzing power, was postulated. It is now realised that lack of a sensitive analytical method led to this hypothesis and that liquefaction is really due to hydrolysis of chain linkages[6]. The belief[7] that an amylophosphatase is necessary for liquefaction is also incorrect since this action occurs with phosphorus-free starch.

As we have seen, the amylolytic breakdown of starch was often used in investigating its structure. Botanists, e.g. NAEGELI, colloid chemists, e.g. MAQUENNE, and enzymologists, e.g. LING, have regarded the portion consumed by amylases as an individual compound, "amylose". Thus they ignored the fact, familiar to organic chemists, that many substances are only partially degraded, and that really the partial degradation is the most important method of structure investigation. LING[1], after many years work on the structure of starch using amylases, arrived at conclusions which are now seen to be untenable. He thought that starch consists of 70% amylose (i.e. everything that yields maltose), 20% amylopectin, which is "depolymerized" to a cyclic hexaose by amylases, and 10% amylohemicellulose which he took to be a Ca-Mg salt of a phosphate-containing hexaose. From his description this last can be nothing other than an impure linear constituent of high D.P. in an insoluble crystalline form.

The discovery of the difference between α- and β-amylases has also led to incorrect deductions that have complicated the already difficult problem of starch structure. KLINKENBERG[2], under the direction of WENT, employed α- and β-amylases to analyse the constituents of starch. He thought to have proved that it consists of two stereo-isomers that can mutarotate. At equilibrium they are found in proportion of 36% α- to 64% β-form. When, however, it is realised that the change α-bond in starch to β-configuration of the maltose reducing group occurs at the moment of hydrolysis by β-amylase, in a kind of Walden Inversion, the hypothesis quoted above is seen to be without foundation. The same observation applies to the hypothesis of BLOM, BAK, and BRAAE[3] which supposes the starch molecule to comprise 30 glucose residues linked by 4 kinds of bond that are distinguished by their reactions with pure α-, pure β-, mixed α- and β-amylases, and with crude malt amylase.

A notable contribution to our knowledge of starch polysaccharide was MYRBÄCK's discovery[4] that branched oligosaccharides containing α–1:6′ bonds occur in the low molecular-weight α-dextrins. In our investigations we degraded the pure polysaccharide constituents with pure β-amylase. The linear fraction was completely degraded, so confirming SAMEC's finding for "amyloamylose". The branched fraction, however, was only degraded to about 65% leaving a β-dextrin that contained all the branch points[5]; these evidently con-

[1] H. P. WIJSMAN, Diss. Amsterdam 1889, Rec. Trav. Chim. Pays-Bas *9*, 1 (1890).
[2] R. KUHN, Ann. Chem. *443*, 1 (1925).
[3] E. OHLSSON, Z. physiol. Chem. *189*, 17 (1930).
[4] M. SAMEC and E. WALDSCHMIDT-LEITZ, Z. physiol. Chem. *203*, 16 (1931).
[5] K. MYRBÄCK and L. G. GYÖRLING, Arkiv. Kemi. Min. Geol. [A], *20*, 5 (1945).
[6] K. H. MEYER, F. DUCKERT, and E. H. FISCHER, Helv. chim. Acta *33*, 207 (1950).
[7] E. WALDSCHMIDT-LEITZ and K. MAYER, Z. physiol. Chem. *236*, 168 (1935).

[1] G. R. LING, in R. P. WALTON, *A Survey of Starch Chemistry* (Chemical catalog Co., New York, 1928), p. 29.
[2] G. A. v. KLINKENBERG, Z. physiol. Chem. *212*, 173 (1932).
[3] J. BLOM, A. BAK, and B. BRAAE, Z. physiol. Chem. *241*, 273 (1936).
[4] A. MYRBÄCK and K. AHLBORG, Biochem. Z. *307*, 69 (1940).
[5] K. H. MEYER and P. BERNFELD, Helv. chim. Acta *23*, 875 (1940).

stitute the hindrances to the enzyme. Since 65% of the fraction was converted to maltose it follows that 70% of the glucose units are in the branches of the molecule. We also found that under the action of a glucosidase from yeast autolysate the α–1:6′ bonds were scinded and that then the β-amylase further degraded the dextrin. These facts can only be explained by a highly ramified structure such as that shown in Figure 3*a*. This structure has been confirmed by CORI[1]; other branched structures such as those of HAWORTH[2] (3*b*) and of STAUDINGER[3] are in contradiction with the facts.

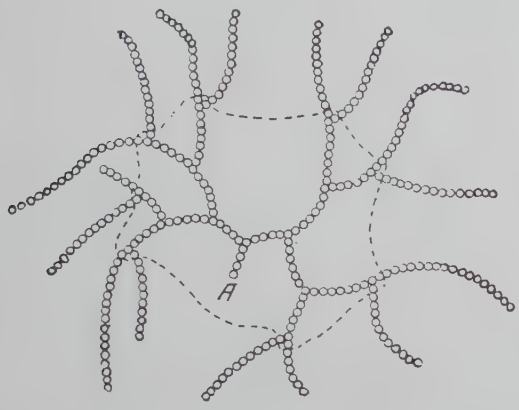


Fig. 3*a*.–Structure of amylopectin proposed by MEYER and BERNFELD. o o o, glucose residues; *A*, reducing group; dotted line, limit of degradation by β-amylase.

As far as the individual products of α-amylase degradation are concerned, starch was treated as a homogeneous substance in almost all the early work. A complete understanding of amylolytic action can however only be attained through investigation of the purified linear and branched component polysaccharides. Attention must also be given to the enzyme because impure samples may contain activators or inhibitors.

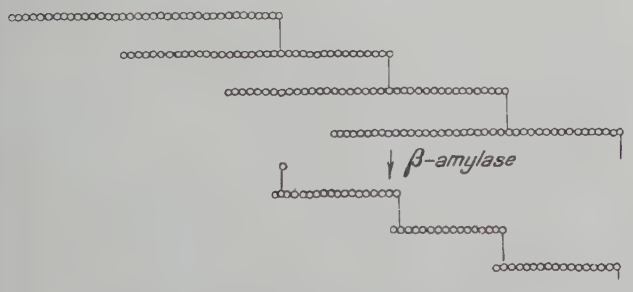


Fig. 3*b*.–Formulae of amylopectin (above) and limit dextrin (below) proposed by HAWORTH.

Many attempts have been made to purify the amylases. The extensive researches of EULER, WILLSTÄTTER, SHERMAN, and HOLMBERGH are noteworthy. While the majority of enzymologists considered enzymes to be proteins, WILLSTÄTTER and WALDSCHMIDT-LEITZ[1] thought that they are nitrogen-free substances belonging to an unknown class of compound. This view can no longer be sustained because, beginning with the β-amylase of sweet potato in 1946, many amylases have been obtained in pure crystalline form and shown to be proteins. We shall refer later to these researches which placed the enzymology of the amylases on a new footing.

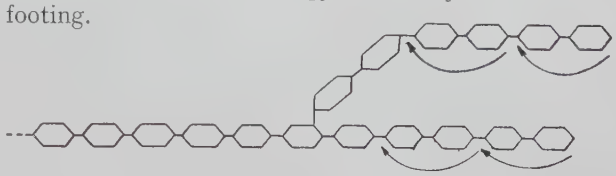


Fig. 4.–Degradation of amylopectin with β-amylase.

(5) *The Starch Polysaccharides.*—Amylose, by which we shall now understand the unbranched polysaccharide, and amylopectin, the branched component, are the principal constituents of starch. Cereal starches contain small quantities of lipids and phosphatides while root and tuber starches are completely free from these impurities; their amylopectins contain small quantities of phosphorus bound to the primary-hydroxyl as ester[2]. All the side branches are attached to the primary-hydroxyl. Branch points other than 1:6′ can be shown to be absent since exhaustive periodate oxidation leaves no unchanged glucose[3]. Hence all units must carry two neighbouring free hydroxyl groups (Fig. 5).

Our later work shows that the granules of common starches contain both low (D.P. 50 → 200) and high (D.P. 200 → 1500) molecular-weight amylose; we refer to them as A_1 and A_2 respectively. They appear to exist in different layers of the granule and fulfil different biological functions. The amylopectin of most starches (B_2) is homogeneous and of high D.P.[4]. However the amylose-free "waxy" starches contain a low molecular-weight amylopectin (B_1) which replaces amylose A_1[5]. Only in tapioca do A_1 and B_1 co-exist[6].

A number of new methods have been discovered for the analysis and characterisation of these polysaccharides. A_1 and B_1 go into solution when the granules are treated with warm water. When a prepared starch solution is saturated with butanol the A_1 and A_2 fraction precipitate as a microcrystalline complex with butanol[7]; any remaining amylose can be removed in combination with stearic acid[4]. Amylose forms a com-

[1] R. WILLSTÄTTER, E. WALDSCHMIDT-LEITZ, and A. R. F. HESSE, Z. physiol. Chem. *126*, 141, 157 (1923); *142*, 14 (1925). – E. WALDSCHMIDT-LEITZ and M. REICHEL, Z. physiol. Chem. *204*, 197 (1932).

[2] T. POSTERNAK, Helv. chim. Acta *18*, 1351 (1935); J. Biol. Chem. *188*, 145 (1951).

[3] G. C. GIBBONS and R. A. BOISSONNAS, Helv. chim. Acta *33*, 1477 (1950).

[4] K. H. MEYER and G. C. GIBBONS, Helv. chim. Acta *33*, 210, 213 (1950).

[5] K. H. MEYER and P. HEINRICH, Helv. chim. Acta *25*, 1639 (1942).

[6] K. H. MEYER (unpublished results).

[7] T. J. SCHOCH, Adv. Carbohydrate Chem. *1*, 247 (1945).

[1] LARNER, ILLINGWORTH, and CORI, Fed. Proc. *10*, 1 (1951).

[2] W. N. HAWORTH, Proc. roy. Soc. [A] *186*, 1 (1946).

[3] H. STAUDINGER and E. HUSEMANN, Ann. Chem. *527*, 195 (1937).

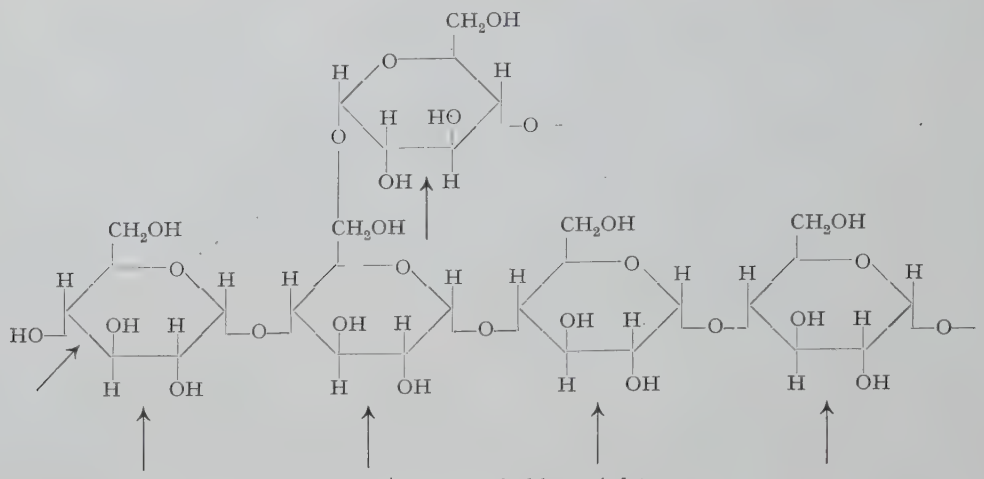


Fig. 5. – ↑ bond attacked by periodate.

plex with iodine more easily than amylopectin. One can therefore determine the amylose content by titrating with KI_3 and measuring potentiometrically the activity of the free I_2[1], alternatively, since the amylose complex is highly coloured, the light absorption of the solution may be measured[2]. The D.P. of the various fractions can be determined colorimetrically[3] by allowing dinitrosalicylic acid to be reduced by the free aldehyde groups of which there is one per molecule.

The branching factor, i.e. the number of non-reducing end-residues divided by the total number of residues, may be determined by the methylation method described above or by periodate oxidation which releases one molecule of formic acid per end residue[4]. The proportion of residues in the outer branches is determined by degradation with pure β-amylase[5]. In Table I is presented some recent results.

[1] F. L. BATES, D. FRENCH, and R. E. RUNDLE, J. Amer. Chem. Soc. *65*, 142 (1943).

[2] R. M. MCCREADY and W. Z. HASSID, J. Amer. Chem. Soc. *65*, 115 (1943).

[3] K. H. MEYER, G. NOETLING, and P. BERNFELD, Helv. chim. Acta *31*, 103 (1948).

[4] T. G. HALSALL, E. L. HIRST, and J. K. N. JONES, J. Chem. Soc. *1947*, 1399, 1427. – K. H. MEYER and P. RATHGEB, Helv. chim. Acta *32*, 1102 (1949).

[5] K. H. MEYER, P. BERNFELD, P. RATHGEB, and P. GÜRTLER, Helv. chim. Acta *31*, 1536 (1948).

The average D.P. exhibits marked differences for the same variety of starch and the starch structure varies in the leaves, fruits, and roots of the same plant[1]. The proportions of amylose and amylopectin and the D.P., determine, amongst other properties, the physical character of the starch. Cereal starches, whose concentrated pastes set rapidly to form strong translucent gels, have a very high molecular-weight A_2 fraction that is barely soluble in water in the pure state and crystallizes from hot pastes. The root, tuber, and waxy-maize starches, which set slowly to transparent gels, do not contain this fraction and therefore do not form the crystals that are responsible for the cloudiness.

The D.P. of the amylopectin controls the water absorption of the swollen grains. Potato, tapioca, and waxy maize contain amylopectin of D.P. $\sim$1500[3] and their granules can swell 100% by weight without bursting. Maize and wheat grains which burst after absorbing 40% water contain amylopectin of D.P. $\sim$300[3]. Further clarification of this point is given in section 7.

[1] K. H. MEYER and P. HEINRICH, Helv. chim. Acta *25*, 1038 (1942).

[2] K. H. MEYER and G. C. GIBBONS, Helv. chim. Acta *33*, 210 (1950).

[3] K. H. MEYER, G. NOELTING, and P. BERNFELD, Exper. *3*, 370 (1947).

Table I

Origin	Amylose					Amylopectin		
	Sub-fraction	%	DP.	MW.	% I_2 absorbed	DP.	MW.	% ramification
Potato . .	A1	10	200	32,000				
	A2	12	700	110,000				
	A1 + A2	22	300	50,000	21·0	1100	178,000	5·0
Maize. . .	A1	10	250	40,000				
	A2	11	2100	340,000				
	A1 + A2	21	450	72,000	21·0	280	45,000	3·0–4·0
Tapioca . .	–	17	300	50,000	20·2	1000	162,000	4·3
Rice . . .	–	17	800	130,000	21·0	1000	162,000	3·0–4·0
Waxy maize	–	0	–	–	–	1850	300,000	4·8

Crude amylose is very easily split into fractions by prolonged treatment with water at different temperatures[1]. Only the fractions of lowest molecular-weight are soluble in cold water; intermediate fractions are soluble in hot water and separate rapidly on cooling; the highest fractions are soluble only in dilute alkali and precipitate on neutralization. Unfractionated amylose is much more soluble than the purified fractions. Its aqueous solutions are supersaturated; the amylose at once begins to form associations of a few molecules which progressively increase in size to form visible particles and finally separate as a cryptocrystalline powder known as "retrograded starch". This "aging" of fresh amylose solutions may be followed by nephelometry or by observation of the resistance to attack by α- or β-amylase[2]. A slightly turbid solution that is only slowly degraded by amylase can be made transparent and accessible to rapid amylolytic breakdown by making alkaline and subsequently neutralizing. It is convenient to designate this operation as "rejuvenation"[3].

Dilute aqueous solutions of amylose to which butanol has been added, precipitate crystalline platelets of an addition product with butanol[4]. The crystals are not, however, composed of solely one sort of molecule; they contain amyloses of different molecular weight and are in this respect analogous to the crystals obtained from degraded rubber or degraded cellulose acetate.

In contrast, amylose crystallizes from concentrated solutions e.g. in formamide, as a translucent elastic gel, very much like a gelatin gel. This phenomenon, common in the chemistry of high polymers, is due to the fact that flexible long chain molecules behave in many respects as if they were composed of "segments" which undergo thermal motions independently of other segments of the same chain. This hypothesis is one of the most important achievements of polymer chemistry. It accounts for the abnormal behaviour of solutions of high polymers[5] and for the low molecular-weights obtained by the usual methods e.g., osmotic pressure and depression of freezing point. It accounts also for the elastic force of stretched elastomers such as rubber; the tendency to return to the unstretched state is due to thermal motion of the segments[6]. It explains also the formation of a gel by crystallization[7]. Segments of different chains can arrange themselves into a lattice with evolution of heat of crystallization, while other segments are still surrounded by the solvent. Therefore different segments of one chain may finally be present in different crystallites; very small crystalline regions or micellae are thus united by molecular filaments forming the coherent elastic structure of a gel. This form of crystal is called a "fringe micelle"[1].

Amylopectin crystallizes in the same lattice as amylose, this is proved by the X-ray diagram of starches not containing amylose, e.g. waxy maize or glutinous rice; it is identical with the diagram of ordinary corn or rice starch[2]. But the whole amylopectin molecule does not fit into a lattice; the branching points remain outside the crystalline regions and only the regular parts of the chains, especially the long outer branches, participate in crystal formation. Hence branches of one amylopectin molecule will be present in different crystallites. Gel formation and, in dilute solutions, formation of clusters of fringe micellae are the forms of crystallization of amylopectin.

(6) *The Structure of Glycogen.*—The structure of glycogen was elucidated concurrently with that of amylopectin. By glycogen was originally understood a polysaccharide, hydrolyzable to glucose, which occurs in animal tissues such as liver and muscle and serves as reserve carbohydrate. Later, polysaccharides occuring in fungi, e.g. yeasts, and higher plants, e.g. maize[3], were found to be indistinguishable from glycogen, and were also so termed.

Glycogen gives a red-brown colour with iodine; it does not form granules but is dispersed in cell protoplasm. Its structure is that of a very highly branched amylopectin[4] of end group content 10%[5]. Physical measurements confirm that the molecule is very compact in shape[6]. Amylases degrade glycogen in the same way as amylopectin. Degradation with β-amylase followed by α-glucosidase and again β-amylase gives similar results as with amylopectin except that the branch segments are much shorter[7]. The irregular construction of the molecule completely prevents crystallization. In the cell, as in aqueous solution, the individual molecules are associated by mechanical entanglement to form large particles. These may be so large that they can be centrifuged from a cloudy solution. Bound protein is not, as has been thought[8], present; neither is phosphorus[9]. Synthesis and break-

[1] K. H. MEYER, P. BERNFELD, and E. WOLFF, Helv. chim. Acta *23*, 854 (1940).
[2] R. H. HOPKINS, E. G. STOPHER, and D. E. DOLBY, J. Inst. Brewing *46*, 426 (1940).
[3] K. H. MEYER, P. BERNFELD, and J. PRESS, Helv. chim. Acta *23*, 1465 (1940).
[4] R. G. KERR and G. M. SEVERSON, J. Amer. Chem. Soc. *65*, 193 (1943).
[5] W. HALLER, Koll.-Z. *56*, 257 (1931). – K. H. MEYER, Z. physik. Chem. [B] *44*, 383 (1939).
[6] K. H. MEYER, G. V. SUSICK, and E. VALKÓ, Koll.-Z. *59*, 208 (1932).
[7] K. H. MEYER and A. J. A. v. d. WYK, Helv. chim. Acta *20*, 1331 (1937).

[1] O. GERNGROSS, K. HERRMANN, and W. ABITZ, Biochem. Z. *228*, 404 (1930).
[2] K. H. MEYER and M. FULD, Helv. chim. Acta *24*, 1404 (1941).
[3] D. L. MORRIS and C. T. MORRIS, J. Biol. Chem. *130*, 535 (1939); *154*, 503 (1944).
[4] K. H. MEYER and M. FULD, Helv. chim. Acta *24*, 375 (1941). – K. H. MEYER, Adv. Enzym. *3*, 109 (1943).
[5] W. N. HAWORTH, E. L. HIRST, and F. A. ISHERWOOD, J. Chem. Soc. *1937*, 577.
[6] H. STAUDINGER and E. HUSEMANN, Ann. Chem. *530*, 1 (1932).
[7] K. H. MEYER and M. FULD, Helv. chim. Acta *24*, 375 (1941).
[8] R. WILLSTÄTTER and M. ROHDEWALD, Z. physiol. Chem. *225*, 103 (1934).
[9] K. H. MEYER and R. JEANLOZ, Helv. chim. Acta *26*, 1784 (1943).

down of glycogen in the reserve organs is by phosphorolysis, in the intestine by amylases.

(7) *The Structure of the Starch Granule.*—Polysaccharide is not extracted from the intact granule by cold water, though those that are damaged are attacked. Hence the soluble constituents are protected by insoluble layers. An understanding of granule construction is clearly necessary for a complete comprehension of the chemical reactions of starch. Nowhere is the granule structure more important than in its behaviour towards warm water. The granules absorb water and become huge bubbles; these shrink if salt or sugar is added to the water and therefore behave like small osmotic cells[1].

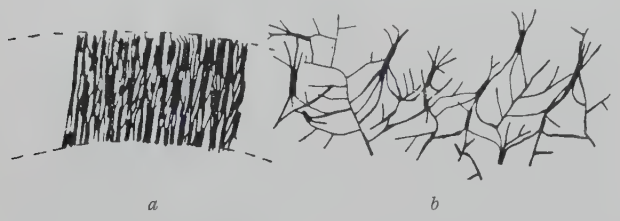


Fig. 6.–Schematic illustration of the submicroscopic structure of the starch granule. Radial section of a layer of the granule: (left) non-swollen granule; (right) swollen granule. Fine lines signify chains or parts of individual chains; thick lines signify crystalline regions.

How can one relate these phenomena to the structure? NAEGELI, MEYER, and KATZ have shown that the granule contains radially ordered needle-like crystals. This, however, only explains the optical and not the swelling and elastic properties of the granule which may be slightly elastically deformed while a true spherulite disintegrates under pressure. The crystallites must therefore be held together by some elastic element. This is accounted for by the tendency of chain polymers to form fringe micelles and, more especially, by the properties of amylopectin which can crystallize only in fringe micelles. In the intact granule the branches of different amylopectin molecules are gathered together in crystalline bundles, these bundles being themselves linked with one another by parts of amylopectin molecules which are not included in the crystal structure (Fig. 6 *b*). This fact explains why, on acid treatment, the granule becomes brittle and easily soluble: the cementing chains are attacked first so that the micelles are easily separable from each other[2].

Microscopical investigation shows that the granule is built up of concentric shells. These shells may be seen by swelling in warm water granules that have been previously heated[3]. Each shell is composed of a resistant outer layer and an inner water-soluble portion. The former does not lose its coherence when highly swollen but forms a large bubble; it consists of 90% amylopectin B_2 plus 10% amylose A_2 which form mixed crystals and are separable only on complete solution[1]. The innerportion of the shell consists of amylose A_1 which is soluble in cold water and may therefore partially dissolve from damaged granules. In waxy starches the resistant layer is entirely of amylopectin B_2 and the inner layer of soluble amylopectin B_1. A special outer membrane does not exist in any kind of starch.

According to FREY-WYSSLING[2] the refractive index of each shell decreases from inside to outside. The layers composed of amylose A_1 are thus optically dense, which is explained by their high crystallinity. On the other hand the outer layers, largely composed of amylopectin, crystallize less well because the branch points must be accomodated between crystallites; however, they are in consequence more resistant.

(8) *Swelling and Setting Phenomena.* – How is the formation on swelling of the large semipermeable membranes to be explained? They must be formed of a molecular network whose mesh allows easier passage of water molecules than of amylose A_1. Hence an osmotic pressure is set up forcing water inwards[3]; subsequently amylose slowly diffuses out and the bubbles collapse. The concentric shells are best observed in previously heated granules[4]. For a long time we speculated on the nature of the cross-links forming the net structure, and we now believe that the points of linkage are the same as in the intact granule, i.e. the crystallites. It is well known that the solubility of a small crystal depends upon its size, thus when the smaller have dissolved some larger ones still remain to form the points of linkage; at higher temperatures these too dissolve and the granule disintegrates. Clearly, the larger the amylopectin molecules that form the shell, the greater will be the extensibility of the shell before it bursts.

The swelling temperature can be raised by an annealing pre-treatment; the proportion of crystalline material increases and the individual crystallites also become larger and less soluble[5].

If starch swells in a small amount of water the shells come into contact and adhere. This also occurs if starch is heated in water without vigorous stirring. Presumably one end of a chain molecule may be fixed in a shell crystallite while the other is "dissolved" and can entangle with similar chains of adjacent shells as a result of thermal motion. Adhesive properties thus appear on a macroscopic scale. Concentrated pastes solidify on cooling and give a coherent elastic gel which is turbid if it contains amylose of high molecular-weight but is otherwise transparent. The solidification

[1] K. H. MEYER and M. FULD, Helv. chim. Acta *25*, 391 (1942).
[2] K. H. MEYER and P. BERNFELD, Helv. chim. Acta *23*, 890 (1940).
[3] N. P. BADENHUIZEN, Rec. Trav. bot. nedl. *35*, 561 (1938).

[1] K. H. MEYER and R. MENZI, Helv. chim. Acta (in press).
[2] A. FREY-WYSSLING, Protoplasma *25*, 261 (1936).
[3] K. H. MEYER and M. FULD, Helv. chim. Acta *25*, 391 (1942.)
[4] N. P. BADENHUIZEN, Rec. Trav. bot. nedl. *35*, 559 (1938).
[5] R. SAIR and W. R. FETYES, Ind. Eng. Chem. *36*, 205 (1944). – R. T. WITTENBERGER and G. C. NUTTING, Ind. Eng. Chem. *40*, 1407 (1948).

Table II

	β-amylase from		α-amylase from					
	Sweet potatoes[1]	Malt[2]	Malt[3]	Asperg. Oryzae[4]	Bacillus subtilis[5]	Swine pancreas[6]	Human pancreas[7]	Human saliva[8]
Activity per mg. N.	2,500[12]	1,665	2,350	2,400	3,600	4,000	6,200	6,200
Activity per mg. enzyme	378	235	315	310	500	630	980	980
% N	15·1	14·1	13·4	12·9	14	15·8	15·8	15·8
% P			0	0	0	0·05	0	0
SH-groups	+	+	−[14]	−	−	−	−	−
Optimum pH	4–5	5·2	4·7–5·4[14]	5·5–5·9	5·3–6·8	6·9	6·9	6·9
Optimum stability pH		4·0–8·0	4·9–9·1[14]	5·5–8·5	4·8–8·5	7–8·5	4·8–11	4·8–11
% solubility at 2° pH 7		15	15[14]	10	6	0·6	0·3	0·3
Activation energy[9]		16,200 (0–20°) 5,530 (20–50°)	7,050[14]	10,650		13,500	13,500	13,500
Molecular weight	152,000[13]		59,500			45,000[15]		
Electrophoretic mobility (pH 7·9, $\mu = 0{\cdot}1$) $\mu \cdot 10^{-5}$ cm^2 · volt^{-1} · s^{-1}		2·4	3·1[14]		3·1	3·1	3·2	3·2
Isoelectric point	4·77[13]	6·0	5·7[14]	4·2		5·2–5·6	5·2–5·6	5·2–5·6
Turnover number[10]			17,000			25,000		
Absorption spectrum (mμ)		280	280	280	280	280	280	280
Activation by Cl^-	−	−	−	−	±	+	+	+
Activation by Ca^{++}	−	−	+	−	−	−	−	−
Ratio *saccharogene* activity (±0·2)[11] dextrinogen	61	62	9·8	9·8	9·8	9·8	9·6	9·6

is hampered mechanically by the presence of very large amylopectin molecules. Limited acid hydrolysis of starch may therefore improve the gel-forming properties of e.g. potato starch.

The influence of the phenomenon of crystallization on the general properties of starch can hardly be overemphasized. In fresh native starch crystallization is incomplete; it can increase over long periods the swelling temperature being thereby raised. The effect of crystallization in bread is very conspicuous, for staling is nothing other than a crystallizing of fringe-micelles[16].

[1] A. K. BALLS, R. L. THOMPSON, and M. K. WALDEN, J. Biol. Chem. *163*, 571 (1946); *173*, 9 (1948).

[2] ED. H. FISCHER, K. H. MEYER, G. NOELTING, and A. PIGUET, Arch. Biochem. *27*, 235 (1950); A. PIGUET and ED. H. FISCHER, Helv. chim. Acta *35*, 257 (1952).

[3] S. SCHWIMMER and A. K. BALLS, J. Biol. Chem. *179*, 1063 (1949).

[4] ED. H. FISCHER and R. DE MONTMOLLIN, Helv. chim. Acta *34*, 1987, 1994 (1951).

[5] KURT H. MEYER, M. FULD, and P. BERNFELD, Exper. *3*, 411 (1947), and unpublished results.

[6] KURT H. MEYER, ED. H. FISCHER, and P. BERNFELD, Helv. chim. Acta *30*, 64 (1947). – ED. H. FISCHER and P. BERNFELD, Helv. chim. Acta *31*, 1831 (1948).

[7] ED. H. FISCHER, F. DUCKERT, and P. BERNFELD, Helv. chim. Acta *33*, 1060 (1950). – P. BERNFELD, F. DUCKERT, and ED. H. FISCHER, Helv. chim. Acta *33*, 1064 (1950).

[8] K. H. MEYER, ED. H. FISCHER, A. STAUB, and P. BERNFELD, Helv. chim. Acta *31*, 2158, 2165 (1948).

[9] ED. H. FISCHER, Helv. chim. Acta (to be published).

[10] Number of glucosidic bond splitted per minute and per 1 mole of enzyme.

[11] P. BERNFELD and M. FULD, Helv. chim. Acta *31*, 1423 (1948).

[12] According to our own experiments.

[13] S. ENGLARD and TH. P. SINGER, J. Biol. Chem. *187*, 213 (1950).

[14] ED. H. FISCHER and C. H. HASELBACH, Helv. chim. Acta *34*, 325 (1951).

[15] C. E. DANIELSSON, Nature *160*, 899 (1947).

[16] F. R. KATZ, Z. physiol. Chem. [A] *150*, 37 (1930); *169*, 321 (1934).

(9) *Pure Amylases.*—Before treating the enzymic degradation of starch it seems convenient to summarize the progress made in the purification of the enzymes themselves.

The choice of method to be adopted for enrichment and purification is rather empirical; fractional precipitation at 0° with acids, acetone, ammonium sulphate, or other salts, and denaturation by heat or agitation and other devices are applied to remove unwanted proteins. At each stage the enrichment is controlled by analysis of nitrogen content and measurement of enzyme activity. Homogeneity is tested for by electrophoresis and when it is attained patient attempts are made to induce crystallization; finally the enzyme is purified by repeated recrystallization.

β-Amylases liberate maltose in the downward rotating β-form; they attack the starch polysaccharide from the non-reducing end of the molecule with the immediate formation of maltose. β-Amylases have been found only in plants; in malt, sweet potato and soya bean. The first crystalline amylase to be isolated (β-amylase) was obtained by BALLS[1] in 1946 from the sweet potato (*Ipomoea batatas*) (Fig. 7); the purification and crystallization of the much longer known β-amylase of malt has only recently been achieved at Geneva[2].

α-Amylases, so called because the aldehydic groups thereby liberated are in the upward rotating α-form,

[1] A. R. BALLS, R. L. THOMPSON, and M. K. WALDEN, J. Biol. Chem. *163*, 571 (1946); *173*, 9 (1948).

[2] K. H. MEYER, ED. H. FISCHER, and A. PIGUET, Helv. chim. Acta *34*, 316 (1951). – A. PIGUET and ED. H. FISCHER, Helv. chim. Acta *35*, 257 (1952).

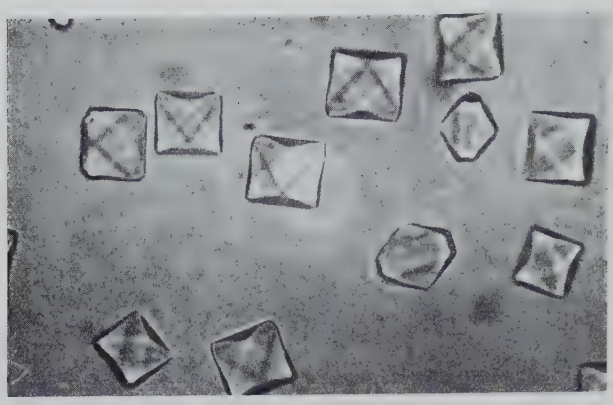


Fig. 7.

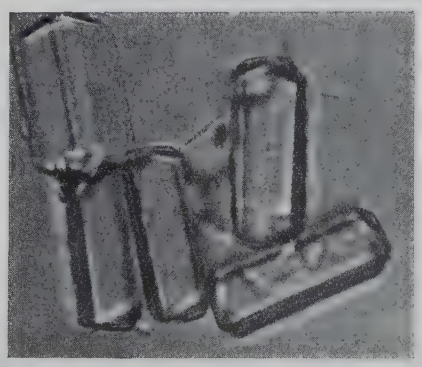


Fig. 8.

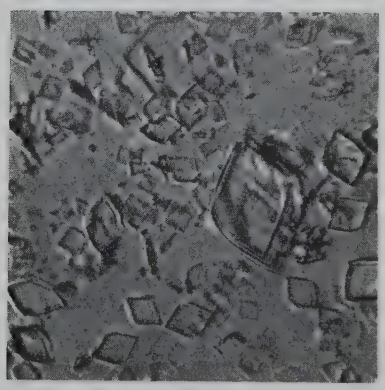


Fig. 9.

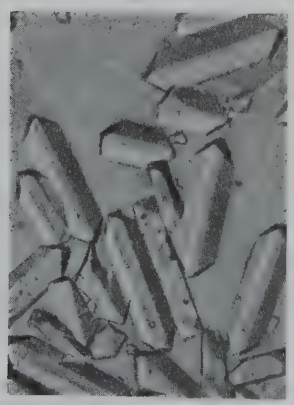


Fig. 10.

initially degrade the starch polysaccharide into large fission products. The first to be purified[1], in the form of beautiful small crystals, was swine pancreas amylase[2]; later, crystalline forms of "ptyalin" (the α-amylase of human saliva[3]) (Fig. 8) and of human pancreas amylase were obtained[4] (Fig. 9). These last two cannot be distinguished from each other but swine pancreas amylase (Fig. 10) is quite certainly different, so that we assume there is only one human amylase. Thus it would appear that it is the species and not the particular organ which determines the constitution of the enzyme.

Of the vegetable α-amylases, malt α-amylase[5] (Fig. 11) and the α-amylases from *Bacillus subtilis*[6] (Fig. 12) and *Aspergillus oryzae*[7] (Fig. 13) have been obtained crystalline. The properties of the amylases are compared in Table II.

(10) *Action of pure amylases on pure amylose and amylopectin.*—The purification of the two constituents of starch–linear amylose and branched amylopectin,– and of the amylolytic enzymes, made it possible to investigate the effects of these substances on each other. This is necessary for a clearer picture of the degradation of starch because in mixed amylases, e.g. malt, many reactions are super-imposed.

Our investigations confirmed the earlier work on β-amylase degradation[8], the enzyme acts from the non-reducing end groups and completely degrades amylose. The findings of some authors[9] that amylose is not fully degraded are probably due to the use of impure samples. Amylopectin is attacked as illustrated by Figure 4; the branch points and, in the case of tuber-starches, the phosphate groups arrest the action of β-amylase. It can be shown that the "limit dextrin" contains the same number of end groups and branch

[1] In a preliminary note of 1931, M. L. CALDWELL, L. E. BOCHER, and H. C. SHERMAN (Science *74*, 37 [1931]) reported the obtention of a crystalline material, very "unstable", of an "enzymic activity almost as high as the maximum observed" by them and claimed to be swine pancreatic α-amylase (?). This material can easely be obtained in the first or second stages of the purification of the enzyme and is certainely not crystalline amylase. It simply consists of inactive proteins, ev. scission products of amylase (ED. H. FISCHER and P. BERNFELD, Helv. chim. Acta *31*, 1839 [1948]), disclosing a certain activity through adsorption of the enzyme, a fact which is easy to show by mere recrystallizations. Crystalline amylase is stable and can be recrystallized.

[2] K. H. MEYER, ED. H. FISCHER, and P. BERNFELD, Exper. *2*, 362 (1946); *3*, 106 (1947). – ED. H. FISCHER and P. BERNFELD, Helv. chim. Acta *31*, 1831 (1948).

[3] K. H. MEYER, ED. H. FISCHER, A. STAUB, and P. BERNFELD, Helv. chim. Acta *31*, 2158 (1948).

[4] K. H. MEYER, ED. H. FISCHER, P. BERNFELD, and F. DUCKERT, Arch. Biochem. *18*, 203 (1948). – ED. H. FISCHER, F. DUCKERT, and P. BERNFELD, Helv. chim. Acta *33*, 1060 (1950).

[5] S. SCHWIMMER and A. K. BALLS, J. Biol. Chem. *176*, 465 (1948).

[6] K. H. MEYER, M. FULD, and P. BERNFELD, Experientia *3*, 411 (1947).

[7] ED. H. FISCHER and R. DE MONTMOLLIN, Helv. chim. Acta *34*, 1987, 1994 (1951). – L. A. UNDERKOFLER and D. K. ROY, Cereal Chem. *28*, 18 (1951).

[8] K. H. MEYER, ED. H. FISCHER, and P. F. SPAHR, Helv. chim. Acta (in press).

[9] S. PEAT, S. G. PIRT, and W. J. WHELAN, J. Chem. Soc. *1952*, 705.

points as the original amylopectin; the enzyme has only been able to attack the long branches[1]. A schematic representation of "limit dextrin" is given.

The investigation of the α-amylase degradation is more difficult. Attack is along the chain and the first products are fragments of high molecular weight, then dextrins of lower molecular weight appear including maltotetraose, maltotriose and branched tri- and tetrasaccharides, the final products are maltose, isomaltose, and glucose.

To estimate these mixtures, the specific fermentation of sugars can be used[2]. The amylase is killed by heating, then *Torula monosa* is added, which ferments glucose only. By estimating the reducing before and after this fermentation the glucose content is obtained by difference. Then *Saccharomyces chodati* is added, whereby glucose, maltose, and much more slowly, isomaltose are fermented. Small amounts of sugars may be detected by paper chromatography. The course of degradation is followed by reductometric determinations and a complete analysis of the products is carried out from time to time.

Investigations on the action of pure pancreas amylase and pure malt α-amylase respectively on pure amylose gave the following results[3].

At very high enzyme concentrations the reaction proceeds approximately at the rate of a monomolecular reaction until 60% maltose and 40% maltotriose are formed; the latter is then split into glucose and maltose by a very slow reaction. The end products are 13% glucose and 87% maltose. At medium enzyme concentrations the reaction decelerates at an earlier stage; this slowing down is due to three different influences.

(a) *Ageing of the amylose*, i.e. formation of submicroscopic associations and crystallites which are resistant to enzymic attack[4]. After rejuvenation and subsequent addition of enzyme the reaction starts again[5].

(b) *The affinity of the enzyme* for the polysaccharide diminishes with decreasing D. P. of the latter[6]. It is generally believed today that the rate of enzymic fission is determined by two factors, the concentration of the enzyme-substrate (in this case amylase-polysaccharide) compound and its decomposition rate. Now according to the law of mass action, ES, the concentration of the compound, depends on the equilibrium

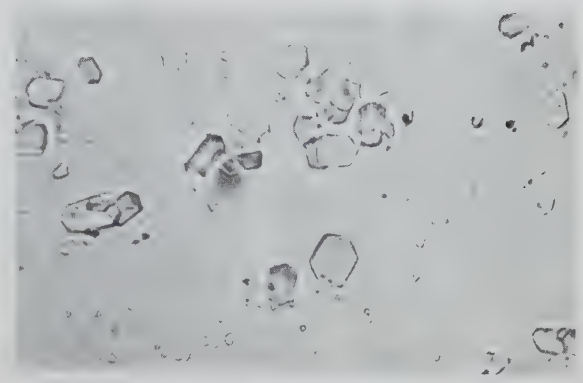


Fig. 11.

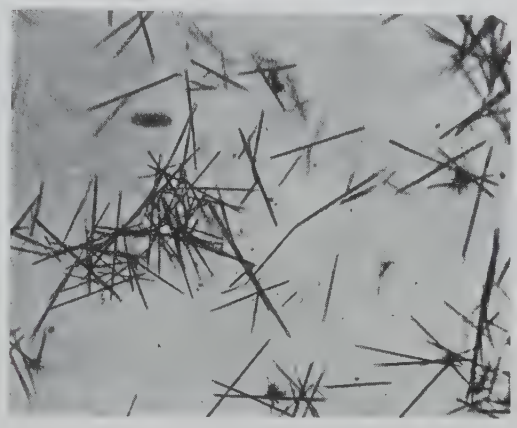


Fig. 12.

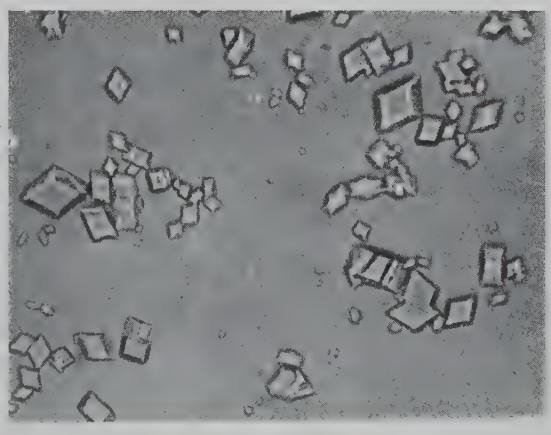


Fig. 13.

constant K and the concentrations of both reactants, enzyme E and substrate S:

$$\frac{ES}{(E-ES)\,(S-ES)} = K.$$

Now if K falls with decreasing degree of polymerization of the substrate present, then the rate of fission must continually decrease as the D. P. is continually diminished[1].

[1] ED. H. FISCHER (in press).

[1] K. H. MEYER, M. WERTHEIM, and P. BERNFELD, Helv. chim. Acta *24*, 212 (1941).

[2] A. J. KLUYVER, Biochem. suikerbepalingen, Leiden (1914). – K. H. MEYER and W. F. GONON, Helv. chim. Acta *34*, 290 (1951).

[3] K. H. MEYER and W. F. GONON, Helv. chim. Acta *34*, 294 (1951).

[4] O. E. STAMBERG and C. H. BAILEY, Cereal Chem. *16*, 330 (1939). – R. M. HOPKINS, E. G. STOPHER, and D. E. DOLBY, J. Inst. Brewing *46*, 426 (1940).

[5] P. BERNFELD and H. STUDER-PECHA, Helv. chim. Acta *30*, 1895 (1947).

[6] K. MYRBÄCK and N. O. JOHANSEN, Arkiv Kemi Min. Geol. (A] *20*, (6) (1945). – K. MYRBÄCK and E. SILHBOM, Arkiv. Kemi *1*, [1) (1949). – R. M. HOPKINS, Adv. in Enzymology *6*, 389 (1946).

(c) *The inhibition by maltose.* Maltose forms with amylase a compound which is not hydrolyzed. Even a great excess of polysaccharide does not displace the maltose from this compound. It must therefore be concluded that the maltose is attached to the enzyme by groups other than those involved in linkage with the substrate[1]. This phenomenon is described as "non-competitive inhibition", and would explain why the maltose is completely unattacked, for, in our opinion, the hydrolytic fission of the enzyme-substrate complex may be ascribed to the distortion of a glucosidic linkage, whereby it is made more accessible to attack by water. If, however, maltose is differently linked to the enzyme, the pre-condition for hydrolytic fission is lacking.

The reaction of pure α-amylase with pure amylopectin proceeds similarly to that with amylose. In a relatively rapid reaction, unbranched and branched oligosaccharides are formed. These slowly undergo fission into maltose, glucose and isomaltose. End products are 72% maltose, 19% glucose and 9% isomaltose. All branch points (α-1:6′ bonds) reappear finally in the form of isomaltose[2].

The affinity of the enzyme for the branched polysaccharides is very small; the considerable diminution of affinity for the substrate during progressive hydrolysis leads to a very marked deceleration of the reaction.

(11) *The degradation of starch.*—(a) *By Malt.*—In this process the four reactions discussed above i.e. the breakdown of amylose by α- and β-amylase and the degradation of amylopectin by the same enzymes proceed simultaneously and influence each other. The following considerations apply. β-Amylase degrades dissolved amylose completely and amylopectin to 60–70% of fermentable sugars, 30% of a nonfermentable limit dextrin being formed. α-Amylase degrades amylose initially only to 70% fermentable sugars and 30% non-fermentable maltotriose. Amylopectin is degraded only to about 60% sugars in the initial reaction. These facts show that the yield in sugars is improved when a mixture of both amylases is used. In β-amylase degradation the limit β-dextrin is split up by addition of α-amylase and the reducing end groups thus liberated can undergo further β-amylase attack. In the case of α-amylase action the addition of β-amylase increases the percentage of maltose and decreases that of triose formed.

Here too, maltose functions as an inhibitor. This explains why the degradation proceeds more rapidly in the presence of yeast; maltose is fermented and the inhibition ceases.

If a high yield of fermentable sugars is desired it is advantageous to employ a large quantity of β-amylase admixed with a small quantity of α-amylase. In contrast, an α-amylase predominance results in a higher yield of non-fermentable oligosaccharides. This condition is achieved in the brewing industry where the β-amylase in green malt is destroyed to a large extent by the torrefaction process.

In the usual starch pastes, granular residues exist along with dissolved components: α-amylase "liquefies" because it will split up the polysaccharides at any point of the surface of a cluster and even of the intact granule. In contrast β-amylase action is confined to the end groups which may be hidden inside. This seems to be the case in the intact starch granule since it is not attacked by pure β-amylase. In a paste the course of reaction will therefore depend on the degree of disintegration.

In technical processes other factors such as temperature, pH, ion content, and the presence or absence of yeast also influence the course of degradation. The actual process can not therefore be forecast and must be established experimentally for each individual case.

(b) *In the human body.*—The attack on starch begins in the mouth and is completed in the intestine by pancreatic juice. Saliva and pancreas contain only α-amylase as amylolytic enzyme; the belief that maltase is present in saliva is incorrect, – the glucose found is produced from maltotriose. A maltase is however secreted by the mucous membrane of the intestine to convert maltose to glucose. How the branched oligo-saccharides are degraded in the intestine is not yet known.

(12) *Other Amylases.*—As already stated the α-1:6′ links are not attacked by the common amylases. However, lately some α-1:6′ amylases have been described —they would be better known as "isoamylases". Isoamylases are found in autolysed brewers yeast[1], in broad bean, potato[2] and other plants[1].

Also of interest is a "glucoamylase" which was obtained from *aspergillus niger* and *rhizopus delemar*; it is analogous to β-amylase and removes one glucose unit at a time from the non-reducing end-residues to the branch points[3]. This enzyme cannot attack glucose units linked by 1:6′ bonds, but there are enzymes which perform this function. Such "amyloglucosidases" occur in autolysed yeast[4] and in muscle[5].

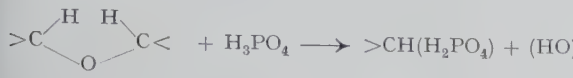
(13) *Phosphorolytic Degradation and Synthesis of Starch Polysaccharides.*–The equilibrium of the reaction:

Polysaccharide + Water → Breakdown products,

lies practically completely on the side of the products. It is therefore impossible to synthesise polysaccharide from glucose or maltose by means of amylases. A great advance was made when PARNAS[6] found that glycogen, which is very similar to amylopectin, may be scinded

[1] S. SCHWIMMER, J. Biol. Chem. *186*, 181 (1950).
[2] K. H. MEYER and W. F. GONON, Helv. chim. Acta *34*, 294 (1951).
[1] B. MARUO and T. KOBAYASHI, Nature *167*, 606 (1951).
[2] P. N. HOBSON, W. J. WHELAN, and S. PEAT, Biochem. J. *47*, 39 (1950).
[3] R. W. KERR, F. C. CLEVELAND, and W. J. KATZBECK, J. Amer. Chem. Soc. *73*, 3916 (1951). – L. L. PHILLIPS and M. L. CALDWELL, J. Amer. Chem. Soc. *73*, 3563 (1951).
[4] K. H. MEYER and P. BERNFELD, Helv. chim. Acta *25*, 404 (1942).
[5] G. T. CORI and J. LARNER, J. Biol. Chem. *188*, 17 (1951).
[6] J. K. PARNAS and T. BARANOWSKI, C. r. Soc. Biol. *121*, 282 (1936).

by phosphorolysis. In presence of phosphorylase, the glucosidic linkages are split with the addition of phosphoric acid, not water



CORI[1] found that glucose: 1:phosphate, since known as Cori-ester, is produced. SCHÄFFNER and SPECHT[2], KIESSLING[3], and CORI[4] showed that the reaction is reversible; from Cori-ester a glycogen-like polysaccharide may be obtained.

The application of this discovery to the plant world is due to HANES[5] who showed that phosphorylase is widely distributed and assists in producing a polysaccharide from glucose phosphate. This polysaccharide was later found to be amylose. The plant phosphorylases can only scind or re-form 1:4′ bonds.

From this synthetic amylose one can obtain a branched polysaccharide with the properties of amylopectin by the action of the "Q" enzyme discovered by BOURNE and PEAT[6]. How the enzyme functions is not yet quite clear. It converts by transglucosidification[7], α-dextrins of an average chain length of more than 42 glucose units to amylopectin[8].

We found a considerable concentration of phosphorylase in potato shoots and hence consider it very probable that starch is transported from the tuber to the points of growth, and conversely, from leaf to reserve organ in the form of glucose:1:phosphate. Whether glucose:1:phosphate is an intermediate in the actual synthesis of leaf starch is not known.

(14) *Amylosucrase, Amylomaltase and Macerans Amylas.*—Several enzymes may both degrade and synthesize polysaccharides of the starch group by transglucosidification, that is, migration of glucosidic bonds, no hydrolysis or phosphorolysis being involved. From cultures of *Neisseria perflava* an enzyme termed amylosucrase has been obtained which transforms sucrose into fructose and an amylopectin-like substance (HEHRE[9]).

$$\underset{\text{sucrose}}{n\,C_{12}H_{22}O_{11}} \longrightarrow (C_6H_{10}O_5)_n + \underset{\text{fructose}}{n(C_6H_{12}O_6)}$$

A similar enzyme, amylomaltase, transforms maltose into a polysaccharide of the starch type and glucose; it occurs in *Escherichia coli* (MONOD)[10].

As early as 1903 SCHARDINGER[1] obtained crystalline dextrins (so-called SCHARDINGER dextrins) by the degradation of starch with *Bacillus macerans*. The reaction is reversible and due to an enzyme[2]. The "dextrins" are closed ring compounds with 6, 7 or 8 glucose residues respectively joined to one another by α-1:4′ linkages[3]. Since these structures are not present in the original starch, care is obviously always necessary in interpreting results obtained with impure enzymes.

Concluding Remarks

We shall now review the general picture of the structure of starch and in so doing will proceed from the structure of the granule to that of the molecule.

Under the microscope one observes well formed granules which show in polarised light the black cross characteristic of spherulites. The granules are built up of concentric shells each of which consists of an outer water-resistant layer that transforms gradually into an inner layer partially soluble in cold water. Both layers contain radially arranged needle-like crystallites. The resistant outer layer consists of 90% of a very highly branched polysaccharide, amylopectin B_2, and 10% of a high molecular-weight linear polysaccharide, amylose A_2. They exist as mixed crystals of submicroscopic dimensions. The numerous branch points of the amylopectin molecules are not in the crystals proper but in the amorphous regions which form an elastic cement between the crystallites. Just as the crystals are connected by molecular fibres so the individual molecules are linked in a lattice. The less resistant inner layers consist of well crystallized low molecular-weight amylose A_1. The outer layers form very fine meshed networks that expand when some of the crystallites dissolve in warm water. Water then enters and the inner layers are attacked, dissolved amylose diffusing out. However, only the small easily soluble crystallites are destroyed in warm water, the larger ones remain to preserve the identity of the swollen bubble-shaped networks. Thus the network is the more extensible the larger its constituent amylopectin molecules. When swollen starch granules come into contact the free ends of molecules from adjacent granules intertwine, and the granules agglutinate. Concentrated pastes of cereal starch set rapidly to very cloudy gels, due to the presence of a very high molecular-weight amylose (A_2) which easily formes large crystallites. This amylose is not present in potato and waxy maize starches whose pastes set slowly to transparent gels containing much smaller crystals.

Starch granules that are very rich in amylose (e.g. wrinkled pea), dissociate on heating in water without

[1] G. T. CORI, S. P. COLOWICK, and C. F. CORI, J. Biol. Chem. *123*, 375 (1938).
[2] A. SCHÄFFNER and H. SPECHT, Naturwissenschaften *26*, 494 (1938).
[3] W. KIESSLING, Biochem. Z. *302*, 50 (1939).
[4] C. F. CORI, G. SCHMIDT, and G. T. CORI, Science *89*, 464 (1939).
[5] C. S. HANES, Proc. Royal Soc. [B] *128*, 421 (1940); [B] *129*, 174 (1940).
[6] L. J. BOURNE and S. PEAT, J. Chem. Soc. *1945* 877.
[7] S. A. BARKER, E. J. BOURNE, and S. PEAT, J. chem. Soc. *1949*, 1712; P. N. HOBSON, W. J. WHELAN, and S. PEAT, J. chem. Soc. *1951*, 596; S. PEAT, Adv. in Enzymol. *11*, 339 (1951).
[8] S. NUSSENBAUM and W. Z. HASSID, J. Biol. Chem. *196*, 785 (1952).
[9] E. J. HEHRE, J. Biol. Chem. *177*, 267 (1949).
[10] J. MONOD and A. M. TORRIANI, C. r. Acad. Sci. *227*, 240 (1948).

[1] F. SCHARDINGER, Zbl. Bact. *22*, 98 (1908).
[2] E. B. TILDEN and C. S. HUDSON, J. Amer. Chem. Soc. *61*, 2900 (1939).
[3] D. FRENCH and R. E. RUNDLE, J. Amer. Chem. Soc. *64*, 1651 (1942).

the typical swelling phenomena. The glutinous starches, which give a purple colour with iodine, contain a low molecular-weight amylopectin in place of the low molecular-weight amylose. Degradation by α- and β-amylases yields results in good agreement with this picture of the constitution and structure of the starch polysaccharides. Intact granules and even granule fragments are not degraded by β-amylases which attack only from the ends of the molecules. α-Amylases, which attack at any part of the molecule, can slowly hydrolyse the intact granule. Neither amylase is able to break the isomaltose link. The type of residue found in a digest depends upon the degree of degradation, proportion of each enzyme, temperature, and content of $Ca^{\cdot}$ and Cl' ions.

We believe that this picture of the structure and constitution of starch covers all aspects of starch chemistry. This end is only to be arrived at by utilising the methods, theories, and data of all branches of natural science—from botany, from organic, physical, and polymer chemistry, from physics, and from enzymology. The frontiers between the individual branches of science are ever tending to disappear; there will remain a unified Science of Nature.

Résumé

Le présent travail retrace l'évolution qu'a subie la chimie de l'amidon de son origine à nos jours.

Avant de faire le point de nos connaissances actuelles sur ce sujet, nous avons jugé indispensable de rappeler la part prise par les botanistes, les colloïdologistes, les chimistes organiciens et les enzymologues à la solution de ce vaste problème. Car ce n'est qu'en faisant la somme des travaux poursuivis dans tant de domaines différents que l'on arrive à une image claire couvrant tous les aspects de la structure et de la constitution de l'amidon.

Les grains d'amidon sont constitués de couches concentriques dont les faces externes sont moins solubles dans l'eau que les faces internes. Ces couches contiennent des cristallites arrangés radialement et responsables du phénomène de la croix noire. Les couches résistantes sont constituées de 90% d'un polysaccharide fortement ramifié, l'amylopectine B_2, et de 10% d'un polysaccharide linéaire de poids moléculaire élevé, l'amylose A_2; ils forment ensemble des cristaux mixtes, quoiqu'une partie de la molécule d'amylopectine subsiste à l'état amorphe, donnant une certaine élasticité au système. Les couches internes, facilement solubles, sont constituées d'amylose A_1 de poids moléculaire bas, bien cristallisée. Dans l'eau chaude, les cristallites les plus solubles se dissolvent et l'amylose A_1 diffuse à l'extérieur pendant que les couches les plus résistantes se gonflent; elles seront d'autant plus extensibles que l'amylopectine qu'elles contiennent sera de poids moléculaire plus élevé. Les propriétés des différents amidons et celles de leurs empois dépendent essentiellement de la nature des polysaccharides présents: elles ont été longuement exposées.

En fin de cet article, nous décrivons les propriétés des enzymes amylolytiques, leur mode d'action et le rôle qu'elles peuvent avoir sur la dégradation et la synthèse des polysaccharides de l'amidon.

Brèves communications - Kurze Mitteilungen
Brevi comunicazioni - Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. – Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

Über vierdimensionale Einsteinräume

Wir betrachten geschlossene vierdimensionale Mannigfaltigkeiten M^4, auf denen eine komplex-analytische Struktur samt einer hermiteschen Metrik

$$ds^2 = g_{j\bar{k}}\, dz^j\, d\bar{z}^k$$

mit

$$R_{j\bar{k}} = -c\, g_{j\bar{k}} \qquad (1)$$

gegeben ist (Einsteinsche Metrik). Die der Metrik zugeordnete alternierende Form ist

$$e = \frac{1}{2\pi 1} g_{j\bar{k}}\, dz^j \wedge d\bar{z}^k,\ de = 0.$$

Die Metrik sei so normiert, dass das Volumen der Mannigfaltigkeit, berechnet durch $\int_M e \wedge e$, gleich 1 wird. Im Ursprung eines geodätischen Koordinatensystems ist dann

$$R_{1\bar{1}1\bar{1}} = R_{2\bar{2}2\bar{2}} = a,$$
$$R_{1\bar{2}2\bar{1}} = R_{2\bar{1}1\bar{2}} = R_{1\bar{1}2\bar{2}} = R_{2\bar{2}1\bar{1}} = b.$$

Die Chernschen Klassen sind ganzzahlige Kohomologieklassen[1], die sich in diesem speziellen Fall durch e berechnen lassen:

$$\Psi_1(z_2) = -c\int_{z_2} e, \quad \Psi_2(z_4) = \int_{z_4} \lambda e \wedge e.$$

[1] S. S. CHERN, Ann. Math. *47*, 85 (1946).

Im Nullpunkt eines geodätischen Koordinatensystems ist

$$c = a + b,\ 2\lambda = a^2 + 2b^2,$$

das heisst

$$c^2 \leqslant 3\lambda \qquad (2)$$

und

$$\lambda > 0 \text{ für } c \neq 0.$$

Wir interessieren uns hier für die Eulersche Charakteristik $\chi = \Psi_2(M)$ und die Selbstschnittzahl der ersten Chernschen Klasse

$$\psi = \Psi_1 \cup \Psi_1(M) = c^2 \int_M e \wedge e.$$

Da die Abschätzung (2) in jedem Punkt gilt, folgt

$$\boxed{0 \leqslant \psi \leqslant 3\chi} \qquad (3)$$

Besonders eingehend lässt sich der Fall $a, b > 0$ diskutieren. Nach einem Satz von BOCHNER[1] gibt es dann auf M^4 keine analytischen Differentialformen, und es gibt auch keine harmonischen Formen ausser e^2. (Dieser Satz lässt sich in unserem Fall noch einfacher mit den Methoden von YANO[3] beweisen.) Dies bedeutet, dass die Bettischen Zahlen von M^4 die des komplexen projektiven Raumes $P^{(2)}$ sind:

$$b_0 = b_2 = b_4 = 1,\ b_1 = b_3 = 0,$$

das heisst $\chi = 3$.

Nach einem Satz von WU und THOM[4] ist auf jeder vierdimensionalen Mannigfaltigkeit $\psi + \chi \equiv 0 \pmod 3$, das heisst in unserem Fall $c^2 + \chi = 3n$, und dies ergibt mit (3): $c = 3$. Wieder nach (3) kann λ in keinem Punkt < 3 sein, also kann es auch nirgends > 3 sein. Dann muss aber im Ursprung eines jeden geodätischen Koordinatensystems $a = 2$, $b = 1$ gelten.

Auf einer vierdimensionalen geschlossenen komplexanalytischen Mannigfaltigkeit ist eine Einsteinsche Metrik (wobei die zur Metrik gehörende Differentialform beim auf 1 normierten Volumen einen ganzzahligen Kozyklus repräsentiert) mit positiver Krümmung und Riccikrümmung nur möglich, wenn die Mannigfaltigkeit die Homologiestruktur des komplexen projektiven Raums (bezüglich komplexen Koeffizienten) besitzt, und nur mit der elliptischen Metrik des komplexen projektiven Raums (als Tensor der Ordnung 2)[5].

H. GUGGENHEIMER

Basel, den 6. September 1952.

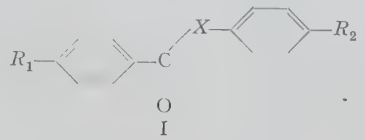
Résumé

On démontre une condition concernant les classes de CHERN qui est nécessaire pour qu'une variété analytique complexe à quatre dimensions puisse être douée d'une métrique einsteinienne. Application aux espaces de courbure strictement positive.

[1] S. BOCHNER, Bull. Amer. Math. Soc. *52*, 776 (1946).
[2] H. GUGGENHEIMER, Proc. Amer. Math. Soc. *2*, 867 (1951).
[3] K. YANO, Ann. Math. *55*, 38 (1952).
[4] W. T. WU, *Sur les puissances de Steenrod*, Coll Top. (Ed. Bibl. nat. universit. Strasbourg 1951).
[5] C. EHRESMANN, C. r. Acad. Sci. *233*, 777 (1951). – Vgl. E. BOMPIANI, Rend. Acc. naz. Lincei *8*, 8, 3 (1951).

Expanded Valence Shell of Sulfur in certain Thiolesters

The ultraviolet absorption spectra (above 220 mμ) of fully aromatic esters and thiolesters (I; R_1 and/or R_2 = H, OCH_3, NO_2; X = O, S) have been investigated with the main aim of ascertaining a possible ability of sulfur to expand its valence shell. Evidence on this point has been obtained and it is summarized in this preliminary report.



I

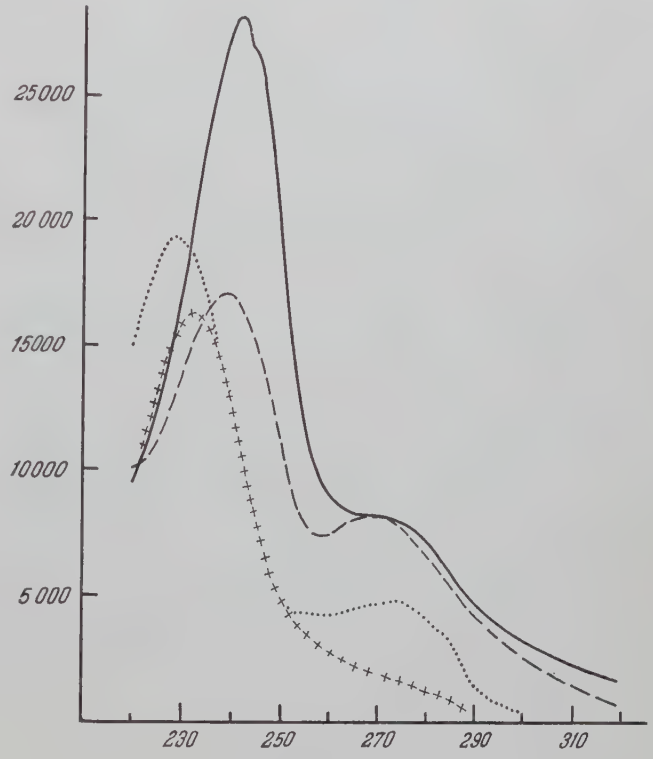
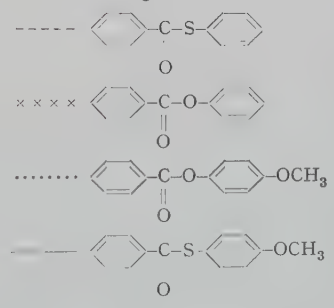


Fig. 1.



in C_2H_5OH

A comparative study of all the light absorption curves, including that of cyclohexyl thiolbenzoate[1], indicates almost certainly that there is no phenylmercapto band in thiolesters where R_2 = H and consequently, that in these thiolesters the sulfur atom interacts with the ring only to a reduced extend. Accordingly, whereas alkyl[2]

[1] H. P. KOCH, J. Chem. Soc. *1949*, 387.
[2] E. A. FEHNEL and M. CARMACK, J. Am. Chem. Soc. *71*, 2889 (1949).

or aryl[1,2] p-nitrophenyl sulfides show the band of the p-nitrophenylmercapto group at about 338 mμ, thiolesters where $R_2 = NO_2$ show this band at 285 mμ.

Gross spectral changes have been observed in thiolesters when hydrogen ($R_2 = H$) is replaced by a methoxyl group ($R_2 = OCH_3$), whereas similar substitution in esters have but little effect on the absorption curves. These changes consist of the development of a new, strong band at about 240 mμ, which was resolved when R_1 was the methoxyl group, overlapped with the benzoyl absorption when R_1 was hydrogen or with the nitrated

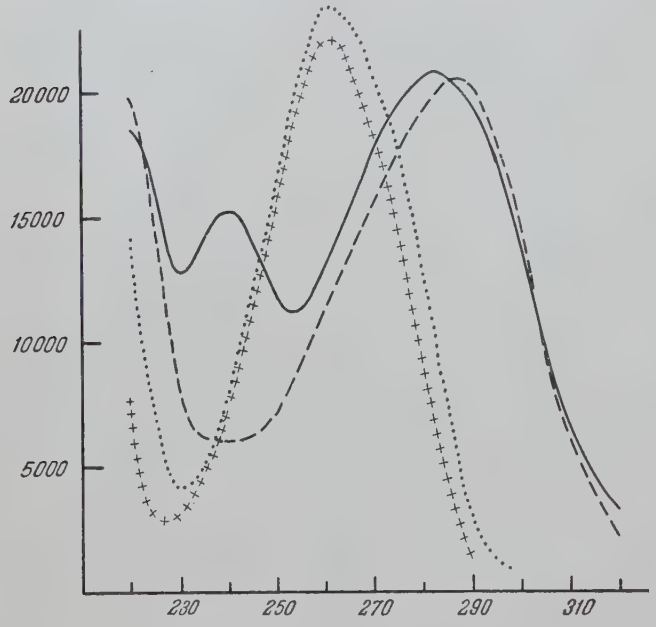
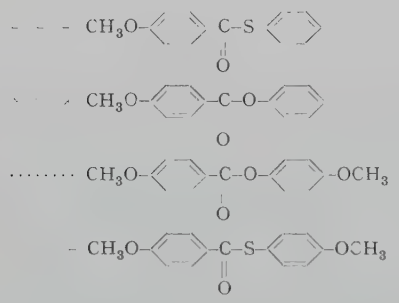


Fig. 2.



in C_2H_5OH

ring band when R_1 was the nitro group. Apparently, the only way to account for this 240 mμ band is by postulating a decet structure for the sulfur atom in the activated state of the corresponding transition:

Provided that this explanation is the correct one, then a further result emerges. Indeed, the nitro group being a better electron acceptor than the methoxyl is an electron donor, and comparing the λ_{max} shift observed on passing from the anisole to the p-anisylmercapto absorption in thiolesters (circa 217 m$\mu \rightarrow$ 240 mμ) to that from the nitrobenzene to the p-nitrophenylmercapto ab-

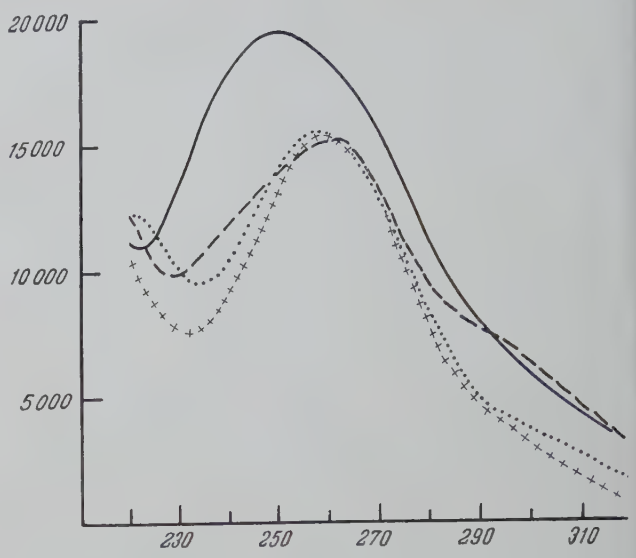
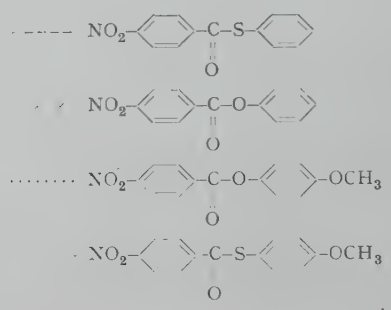


Fig. 3.



in C_2H_5OH

sorption in thiolesters (circa 260 m$\mu \rightarrow$ 285 mμ), it is deduced that sulfur acts as an electron acceptor in activated thiolesters where $R_2 = OCH_3$ at least with the same ability as it acts as an electron donor in those activated thiolesters where $R_2 = NO_2$.

G. Cilento

Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, June 19, 1952.

Riassunto

Lo spettro di assorbimento U.V. di esteri e tioesteri aromatici indica che nello stato eccitato di certi tioesteri l'atomo di zolfo fà uso d'una orbitale 3*d*.

Biologische Hydroxylierungen von Steroiden[1]

Vor einiger Zeit konnten wir[2] die Bedingungen der Hydroxylierung in 11β-Stellung von 17-Oxy-11-desoxy-corticosteron (Reichsteins Substanz *S*) und von 11-Desoxy-corticosteron mittels *Homogenaten von Nebennieren* festlegen. Solche Reaktionen haben auch wei-

[1] H. P. Koch, J. Chem. Soc. *1949*, 387.

[2] H. H. Szmant and J. J. McIntosh, J. Amer. Chem. Soc. *73*, 4356 (1951). – A. Mangini and R. Passerini, J. Chem. Soc. *1952*, 1168.

[1] *Über Steroide*, 111. Mitteilung. [110. Mitt. Helv. chim. Acta *35*, 284 (1952)]. Vgl. vorläufige Mitteilung anlässlich des Symposiums über «Probleme des Hypophysen-Nebennierenrindensystems», Freiburg i. Br., 8. Juni 1952.

[2] F. W. Kahnt und A. Wettstein, Helv. chim. Acta *34*, 1791 (1951).

terhin grosses Interesse gefunden[1,2]. An dieser Stelle ist es nicht möglich, näher auf unsere seitherigen Beobachtungen einzugehen. Es sei lediglich bemerkt, dass sich in präparativen Ansätzen das entstandene 17-Oxy-corticosteron (Substanz *M* nach REICHSTEIN, *F* nach KENDALL) jetzt mit Ausbeuten bis zu 60% isolieren liess. Wie früher erwartet, konnten Zusätze von Adenosintriphosphat[2] (ATP., 0,004 molar), von Muskel-Adenylsäure (etwa 0,006 molar)[3] oder von Glutathion die Fumarsäure in ihren Cofaktor-Eigenschaften weitgehend ersetzen, während Cytochrom (0,02%)[3] ihre Wirkung steigerte, Cozymase (DPN., 0,0003 molar) aber kaum wirkte.

Neuerdings haben wir nun mit Erfolg die elegante Methode von PETERSON und MURRAY[4] zur *mikrobiologischen Hydroxylierung* von Steroiden insbesondere in 11α-Stellung verwendet.

Dabei wurde eine 24stündige Schüttelkultur eines ausgewählten Stammes der Gattung Rhizopus in einem Pepton-Glukose-Maisquellwasser-Medium (pH 6,1) hergestellt, zu dieser 0,025% des betreffenden Steroids, in Methanol oder Aceton gelöst, zugegeben und das Ganze weitere 24 h bei 25° inkubiert. Das Kulturfiltrat (pH 8,0) wurde mit Essigester oder Methylenchlorid extrahiert und der Rückstand nach der Durchlaufmethode an Aluminiumoxyd oder Silicagel chromatographiert. Die einzelnen Eluate sowie die umkristallisierten Reaktionsprodukte wurden papierchromatographisch[5] auf Einheitlichkeit geprüft.

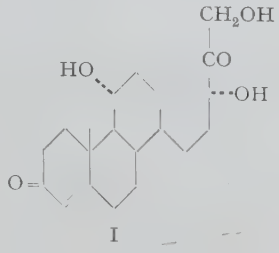
Im Falle der von den genannten Autoren beschriebenen Oxydation von Progesteron konnte statt der angegebenen zehnprozentigen Ausbeute an 11α-Oxy-progesteron eine solche von rund 40% erhalten werden[6].

Im weiteren wurde Substanz *S* nach dieser Methode hydroxyliert. Das in etwa dreissigprozentiger Ausbeute gewonnene 11-Epimere des wichtigen Nebennierenrinden-Hormons 17-Oxy-corticosteron (Substanz *M* bzw. *F*), das Δ^4-11α,17α,21-Trioxy-pregnen-3,20-dion (I), schmolz bei 207–211° k, $[\alpha]_D^{25} = +115° \pm 3°$ (in Äthanol)[7].

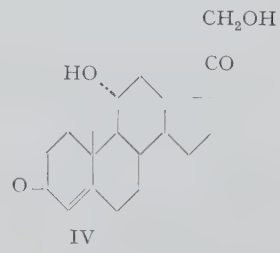
$C_{21}H_{30}O_5$: ber. C 69,58, H 8,34%, gef. C 69,63, H 8,31%. Die Substanz lieferte mit Azetanhydrid in Pyridin bei 40° ein 11α,21-Diazetat (II) vom Smp. 206–211° k, $[\alpha]_D^{26} = +126° \pm 3°$ (in Äthanol) oder $[\alpha]_D^{26} = +118{,}5° \pm 3°$ (in $CHCl_3$), das im Gemisch mit einem von REICHSTEIN und LARDON[8] auf chemischem Wege hergestellten Präparat keine Schmelzpunkterniedrigung zeigte.

$C_{25}H_{34}O_7$: ber. C 67,24, H 7,68%, gef. C 66,99, H 7,78%.

Durch partielle Azetylierung mit Azetanhydrid in Dioxan-Pyridin bei 22° ging I in ein amorphes 21-Monoazetat (III) über, das mit Chromsäure in Eisessig Cortisonazetat lieferte (Mischschmelzpunkt). Bei analoger Oxydation ergab das freie I Adrenosteron (Mischschmelzpunkt). Damit ist seine Konstitution bewiesen.



I



IV

Die Oxydation von Desoxycorticosteron mit der Rhizopus-Kultur lieferte das Δ^4-11α,21-Dioxy-pregnen-3,20-dion (IV) vom Smp. 158–159° k, $[\alpha]_D^{25} = +171° \pm 4°$ (in Äthanol)[1].

$C_{21}H_{30}O_4$: ber. C 72,80, H 8,73%, gef. C 72,95, H 8,86%.

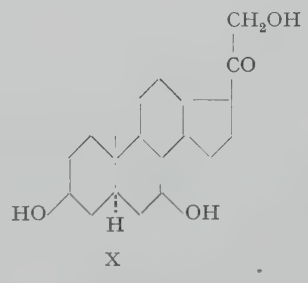
Sein in analoger Weise wie II hergestelltes Diazetat (V) schmolz als derbe Rhomben bei 126–127° k oder als feine Nadeln bei 142–144° k, $[\alpha]_D^{27} = +155° \pm 4°$ (in $CHCl_3$),

$C_{25}H_{34}O_6$: ber. C 69,74, H 7,96%, gef. C 69,92, H 8,14%, das 21-Monoazetat (VI) bei 166–167° k, $[\alpha]_D^{27} = +181° \pm 4°$ (in Dioxan).

$C_{23}H_{32}O_5$: ber. C 71,10, H 8,30%, gef. C 71,17, H 8,60%.

VI ergab bei der Chromsäure-Oxydation 11-Dehydrocorticosteron-azetat (VII), IV die Δ^4-3,11-Diketo-ätiocholensäure (VIII). Die Schmelzpunkte von VII und des Methylesters von VIII[2] im Gemisch mit authentischen Präparaten zeigten keine Depression.

Schliesslich sei hier noch die Hydroxylierung des gesättigten 3β,21-Dioxy-allopregnan-20-on (IX)[3] angeführt. Sie trat überraschenderweise nicht in 11α-, sondern in 7β-Stellung ein, führte also zum 3β, 7β, 21-Trioxy-allopregnan-20-on (X)



X

[1] Siehe zum Beispiel W. J. HAINES, Recent Progr. Horm. Res. *7*, 279 (1952). – R. I. DORFMAN und M. HAYANO, Ciba Found. Colloquia Endocrinol. *2*, 375 (1952).

[2] M. HAYANO, R. I. DORFMAN und E. Y. YAMADA, J. Biol. Chem. *193*, 175 (1951). – M. HAYANO und R. I. DORFMAN, Arch. Biochem. *36*, 237 (1952); Feder. Proc. *11*, 228 (1952). – J. E. PLAGER und L. T. SAMUELS, ibid., S. 383. – Vorträge von L. T. SAMUELS und R. I. DORFMAN in London und Basel, Juli 1952.

[3] Sigma Co., St. Louis, Mo., USA.

[4] D. H. PETERSON und H. C. MURRAY, J. Amer. Chem. Soc. *74*, 1871 (1952).

[5] R. NEHER und A. WETTSTEIN, Helv. chim. Acta *34*, 2278 (1951).

[6] Anmerkung bei der Korrektur: Vgl. auch die Angabe von O. MANCERA und Mitarbeiter, J. Amer. Chem. Soc. *74*, 3712 (1952).

[7] Daraus errechnet sich: $M_D = +417$. Da die M_D der Substanz *M* in Äthanol +605 (REICHSTEIN), diejenige der Substanz *S* +485 (eigene Bestimmung) beträgt, ergibt sich in unserem Falle ein $M_D^{11\beta} - M_D^{11\alpha}$ von +188 und ein Drehungsbeitrag des 11α-Hydroxyls von –68. Diese Werte stimmen richtungs- und grössenordnungsmässig mit denjenigen von L. F. FIESER und M. FIESER, *Natural Products Related to Phenanthrene* (New York 1949), S. 217–218, aus der Cholansäure-Reihe überein (+120 bzw. –34).

[8] Vortrag London, Ciba-Foundation vom 4. Juli 1952. Wir danken Herrn Prof. REICHSTEIN auch an dieser Stelle für Überlassung einer Vergleichsprobe. Anmerkung bei der Korrektur: Vgl. auch das von J. ROMO und Mitarbeiter, Chem. a. Ind. *32*, 783 (1952), auf chemischem Wege erhaltene Diazetat mit etwas abweichenden Eigenschaften. Die in dieser neuen Arbeit sogar im Titel genannte Grundsubstanz I wird dort nicht beschrieben, wohl aber zusammen mit anderen interessanten Hydroxylierungsprodukten in dem soeben erschienenen, ausführlichen Am. Pat. 2602769 von Peterson & Murray.

[1] Das 11-Epimere von Corticosteron besitzt also $M_D = +592$. Da die M_D für Corticosteron und 11-Desoxy-corticosteron +773 bzw. +588 betragen (REICHSTEIN), berechnen sich in diesem Falle $M_D^{11\beta} - M_D^{11\alpha}$ zu +181, der Drehungsbeitrag des 11α-Hydroxyls zu +4.

[2] T. REICHSTEIN, Helv. chim. Acta *20*, 953 (1937). – H. L. MASON, W. M. HOEHN, B. F. MCKENZIE und E. C. KENDALL, J. Biol. Chem. *120*, 719 (1937).

[3] Smp. 171–176° k, $[\alpha]_D^{26} = +87° \pm 2°$ (in $CHCl_3$). Hergestellt aus dem bekannten Diacetat (T. REICHSTEIN und J. VON EUW, Helv. chim. Acta *22*, 1209 [1939]) durch Verseifung mit Hydrogencarbonat in Methanol.

vom Smp. 205–213° k und $[\alpha]_D^{25} = +106° \pm 3°$ (in Äthanol).

$C_{21}H_{34}O_4$: ber. C 71,96, H 9,78%, gef. C 71,73, H 9,88%.

Seine Konstitution wurde bewiesen durch Oxydation mit Chromsäure und Behandlung mit Diazomethan, die zum 3,7-Diketo-ätio-allocholansäure-methylester (XI) führten. Dieses Präparat zeigte keine Schmelzpunktserniedrigung im Gemisch mit authentischem XI[1], während mit dem 3,11-Diketo-ester eine starke Depression eintrat. Die sterische Lage der 7-Hydroxylgruppe (β) ergibt sich aus dem Vergleich der molekularen Drehungen[2].

Die mikrobiologische Hydroxylierung[3] hat gegenüber derjenigen mit Nebennieren-Homogenaten den grossen Vorteil, dass die Reaktionsprodukte meist leichter abzutrennen sind, da die Kulturen keine Vielzahl von nahe verwandten Verbindungen (Nebennierenrinden-Hormone aus der Drüse) enthalten. Damit wird auch die Zuordnung von in kleinen Mengen anfallenden Nebenprodukten zum Reaktionsgeschehen sicherer. Im Gegensatz zu den rein chemischen Methoden, die im allgemeinen die nur schwer verseifbaren 11α-Azetoxy-Derivate liefern, erhält man bei der mikrobiologischen Gewinnung die *freien* 11α-Oxy-Verbindungen, die einzig für die Testierung der Aktivität in Frage kommen.

Im Hinblick auf die in letzter Zeit erneut in Gang gekommene Suche nach der noch unbekannten Substanz aus Nebennieren mit stark «mineralocorticoider» Wirkung[4], bei der man auch Epimere der bekannten Nebennieren-Steroide in Betracht zieht, wurden die Verbindungen I (11-epi-*M*), IV (11-epi-Corticosteron) und X im Überlebenstest an epinephrektomierten Hunden geprüft[5]. Alle drei Substanzen waren bei täglich einmaliger, subkutaner Injektion in öliger Lösung wenn überhaupt, so wesentlich schwächer wirksam als Desoxycorticosteron.

F. W. Kahnt, Ch. Meystre, R. Neher,
E. Vischer und A. Wettstein

Forschungslaboratorien der Ciba Aktiengesellschaft, Basel, Pharmazeutische Abteilung, den 10. August 1952.

Summary

New observations on the necessary cofactors for the hydroxylation of steroids using adrenal homogenates are described.

By microbiological hydroxylation of steroids preferably in 11α-position using molds i. a. the new 11-epimers of corticosterone and 17-hydroxy-corticosterone have been obtained. They are lacking high mineralocorticoidal activity.

[1] T. Reichstein und H. G. Fuchs, Helv. chim. Acta *22*, 1160 (1934).

[2] M_D (X)–M_D (IX) = + 80. Drehungsbeitrag des 7β-Hydroxyls in der 7-Oxy-cholestanolreihe = + 121, des 7α-Hydroxyls = — 60 (vgl. Fieser und Fieser, l. c., S. 216).

[3] Vgl. auch die Einwirkung von Streptomyces-Stämmen, die nach D. R. Colingworth, M. P. Brunner und W. J. Haines, J. Amer. Chem. Soc. *74*, 2381 (1952), zu 11β-Oxy-Verbindungen führt, sowie diejenige von Proactinomyces-Stämmen zu 16α-Oxy-Verbindungen: D. Perlman, E. Titus und U. Fried, J. Amer. Chem. Soc. *74*, 2126 (1952).

[4] J. F. Tait, S. A. Simpson und H. M. Grundy, Lancet *262*, 122 (1952). – S. A. Simpson und J. F. Tait, Endocrinology *50*, 150 (1952). – H. M. Grundy, S. A. Simpson und J. F. Tait, Nature *169*, 795 (1952).

[5] Dr. F. Gross von unserer biologischen Abteilung danken wir für die Durchführung dieser Teste.

Über ein neues Trisaccharid

Im Verlauf papierchromatographischer Untersuchungen über die Beziehungen zwischen Nektar und Phloemsaft wurden verschiedene Monosaccharide in die Stoffleitungsbahnen von *Impatiens Holstii* eingeführt. Die extrafloralen Nektarien von Impatiens sezernieren unter natürlichen Bedingungen im Gegensatz zu den meisten übrigen Pflanzen reine Saccharose. Durch die Injektion eines Monosaccharids (Arabinose, Glukose, Fruktose, Sorbose usw.) ins Phloem trat im Nektar eine ganze Reihe von Zuckern auf, nämlich Fruktose, Glukose, Saccharose, Raffinose und ein neuer Zucker, nennen wir ihn «Impatiose». Der R_F-Wert der Impatiose, der mit der Trennlösung Butanol–Essig–Wasser[1] zwischen denjenigen von Saccharose und Raffinose liegt, lässt auf ein Di- oder Trisaccharid schliessen (siehe Tabelle). Der Zucker reagiert mit den üblichen Entwicklungsmitteln genau wie Saccharose, das heisst mit Naphthoresorzin-Trichloressigsäure[1] rot, Anilinoxalat[2] braun und Anilinphthalat[3] schwach braun. Mit Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)[4] entwickelt, zeigt der Zucker keine Reaktion, das heisst, er ist nicht reduzierend.

	R_{Fr}
Raffinose	0,25
Impatiose	0,35
Glukose-Fruktosid	0,52
Saccharose	0,58
Glukose	0,84
Fruktose	1,00

Es wurden quantitative Bestimmungen der Hydrolysate durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde der Zucker nach dem Trennungsvorgang aus dem Chromatogramm extrahiert und auf ein neues Filterpapier aufgetragen. Die Hydrolyse erfolgte direkt auf dem Papier mit Invertase[5]. Auf diese Weise können die Hydrolysate gleich darauf chromatographiert werden. Die quantitativen Bestimmungen wurden auf zwei verschiedene Arten durchgeführt, einerseits mit TTC, anderseits wurden die Chromatogramme mit Anilinoxalat entwickelt und die Flecke planimetriert[6]. Das Resultat war bei beiden Methoden Fruktose: Glukose = 2:1. Eine partielle Hydrolyse mit *n*/50 HCl ergab Fruktose + Glukose + Saccharose. Das Ganze deutet also daraufhin, dass es sich um ein Trisaccharid handelt, das aus Saccharose und Fruktose besteht. Die hydrolytische Spaltung mit Invertase war in zwei Fällen nacheinander unvollständig. Beide Chromatogramme wurden mit TTC entwickelt und zeigten Fruktose + Glukose (Spur) + einen Fleck (reduzierend!) direkt über Saccharose. Es handelt sich in diesem Fall offenbar um die Spaltung der Saccharose des Trisaccharids. Der dritte Fleck müsste dann das reduzierende Glukose-Fruktosid sein.

Bringt man in einige Kubikzentimeter einer siebenprozentigen Lösung reinster Saccharose 100 μg des ver-

[1] S. M. Partridge und R. G. Westhall. Biochem. J. *42*, 238 (1948).

[2] S. M. Partridge, Biochem. Soc. Symposia *1951*, Nr. 3, 52.

[3] S. M. Partridge, Nature *164*, 443 (1949).

[4] K. Wallenfels, Naturwissenschaften *37*, 491 (1950).

[5] K. T. Williams und A. Bevenue, Science *113*, 582 (1951).

[6] R. B. Fisher, D. S. Parsons und G. A. Morrison, Nature *161*, 764 (1948).

änderten Impatiensnektars, und stellt man diese Lösung in den Kühlschrank, so findet man nach 1½–2 Monaten nicht mehr reine Saccharose, sondern ein Gemisch von Fruktose + Glukose + Saccharose + Impatiose. Die Glukose ist in deutlich messbar grösserer Menge vorhanden als die Fruktose, was wiederum auf die postulierte Zusammensetzung des Trisaccharids hinweist. Für die Veränderung der Saccharose kann eine Bakterieninfektion nicht in Frage kommen, denn erstens ist die Lösung steril, und zweitens zeigt eine mit Bakterien oder Pilzen infizierte Lösung stets dehydrierte Produkte. Es können nur Fermente für diesen Umbau verantwortlich gemacht werden, die von der Pflanze mit dem Nektar ausgeschieden wurden.

Da es sich durchweg um Durchlaufchromatogramme handelt, wird statt dem R_F-Wert der R_{Fr}-Wert (auf die Fruktose bezogen) angegeben.

M. Zimmermann

Pflanzenphysiologisches Institut der ETH., Zürich, den 11. August 1952.

Summary

After the injection of different monosaccharides into the phloem of *Impatiens Holstii*, several sugars can be detected in the nectar usually consisting of pure saccharose. Paper chromatography indicates that besides fructose, glucose, saccharose and raffinose a new sugar called "impatiose" is secreted. Hydrolysis suggests that "impatiose" is a trisaccharide composed of two molecules of fructose and one molecule of glucose. The nectar contains enzymes which cause the transformation of sugars.

A New Method for Qualitative and Quantitative Study of Aminoaciduria by Paper Chromatography

The qualitative and quantitative determination of the amino acids excreted in urine has become of importance for the diagnosis of several diseases. Direct paper chromatography of urine samples usually gives poor results. Concentration of many amino acids is low in both normal and pathological human urines, and the presence of urea and salts interfers with the chromatographic separation and the quantitative evaluation.

We have found that preliminary decomposition of urea by urease, followed by desalting of the concentrated urine sample, gives normal, clear chromatograms, without modification of the *Rf* values obtained with pure amino acids solution. This method so increases the sensitivity that traces of amino acids in urine, hitherto undetectable by usual methods, are easily revealed. Such sensitive qualitative analysis is already giving very valuable data to the clinician. For a more accurate evaluation of the amounts of amino acids present, the quantitative determination according to Boissonnas[1] is applied and gives results reproducible within a relative limit of ± 10%, which is quite satisfactory for a quantitative clinical study of aminoaciduria.

To 250 cm³ of the urine to be examined, contained in a 300 cm³ round-bottomed neck flask, are added 5 mg of commercial urease (Bios Laboratories Inc., New York). After 24 h at room temperature the flask is placed in a boilling water bath and a glass tube of 5 mm width, connected to a water pump, is introduced through the neck of the flask so as to reach to about 1 cm above the level of the urine. This procedure allows the concentration of the urine to less than 10 cm³ in 2 to 3 h. The volume of the liquid is completed to 10 cm³ and after filtration the solution is placed in the desalting apparatus described by Consden, Gordon and Martin[1]. By the use of an initial current of 1 A the solution is desalted within 4 to 5 h. The solution obtained is eventually neutralized to litmus by a few drops of 1 *M* sodium bicarbonate solution and is now ready for chromatographic separation. The paper chromatographic separation can be effected by any procedure already described for the separation of amino acids from protein hydrolysates[2]. The analysis is effected in triplicate, using 20 mm³ of concentrated desalted urine for each chromatogram. After the chromatographic runs, it is important to dry the paper sheets at temperatures not exceeding 50°C in order to avoid the partial destruction of amino acids which occurs, in the presence of organic solvents, by heating over 50°C. Traces of phenol, which often interfer with the revelation or the chromatography in another direction, are best removed by running 2 chromatographies with ether, which bring the phenol to the front line without displacing the amino acids.

The dry sheets are then heated for 2 h at 100°C and examined under ultraviolet light. The spots are lightly marked with pencil. One sheet is sprayed with a highly sensitive ninhydrine reagent (400 mg of ninhydrine, 90 cm³ of secondary butyl alcohol, 5 cm³ of 1 N aqueous NaOH and 5 cm³ of 2 *N* aqueous acetic acid) and heated for 5 min at 100°C. By comparison with the amino acid spots appearing on this first sheet, the position of the spots on the two other, unrevealed sheets is definitively marked with a pencil. Those two sheets are uniformly sprayed with a 1% methanolic solution of KOH, dried 10 min at 50°C, and the marked spots are cut from the sheets. The amount of amino acids they contain is determined colorimetrically according to Boissonnas[3]. The results of this duplicate analysis agree within a relative limit of ± 10%.

R. A. Boissonnas and S. Lo Bianco

Department of Organic Chemistry, University of Geneva, August 15, 1952.

Résumé

Une nouvelle méthode pour l'analyse qualitative et quantitative des acides aminés excrétés dans l'urine est décrite. L'urine, concentrée, désalifiée et débarrassée de l'urée qu'elle contient, est soumise à une chromatographie sur papier, et les acides aminés sont déterminés qualitativement ou dosés quantitativement par colorimétrie.

Des traces d'acides aminés, qui ne pouvaient jusqu'ici être mises en évidence par les techniques décrites dans la littérature, peuvent facilement être détectées par cette nouvelle méthode.

[1] R. Boissonnas, Helv. chim. Acta *33*, 1981 (1950).

[1] R. Consden, A. H. Gordon, and A. J. P. Martin, Biochem. J. *41*, 591 (1947).

[2] R. Williams and H. M. Kirby, Science *107*, 481 (1948). – R. A. Boissonnas, Helv. chim. Acta *33*, 1966 (1950). – C. E. Dent, Biochem. J. *43*, 169 (1948). – R. Consden, A. H. Gordon, and A. J. P. Martin, Biochem. J. *38*, 224 (1944).

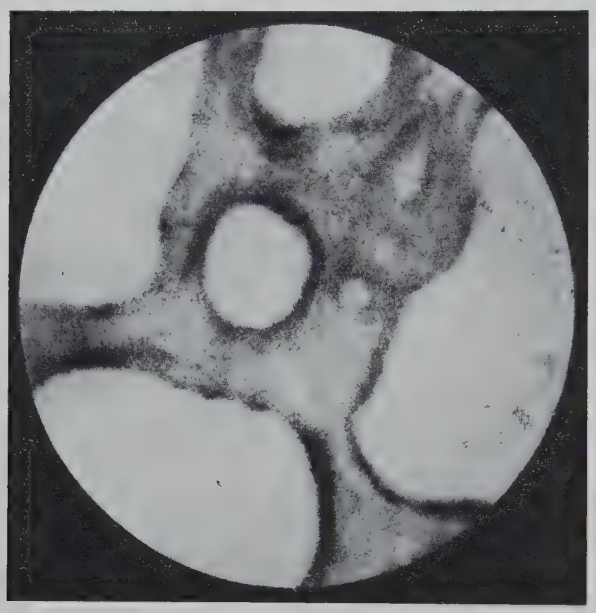
[3] R. A. Boissonnas, Helv. chim. Acta *33*, 1981 (1950).

Autoradiographies du tissu osseux spongieux[1]

La microradiographie permet d'affirmer[2] que le tissu osseux compact de l'adulte n'est pas uniformément calcifié: les ostéones de dernière formation accusent une moindre teneur en calcium que les ostéones ou les fragments d'ostéones plus anciens.

De plus, il ressort d'images autoradiographiques publiées récemment par Amprino[3] que les ostéones les moins calcifiés sont précisément ceux qui, *in vitro*, fixent le radiocalcium avec le plus d'avidité.

Avant de rechercher la signification de ce fait, il convenait de se demander si le tissu osseux spongieux obéit à la même loi que le tissu osseux compact.



Autoradiographie (×38) illustrant la fixation *in vitro* de radiocalcium sur le tissu osseux spongieux (extrémité inférieure du tibia d'un homme de 38 ans). Les portions du tissu les plus radioactives sont les lamelles osseuses de dernière formation.

Pour répondre à la question, il fallait d'abord résoudre un problème technique: couper le tissu spongieux non décalcifié de façon à obtenir, pour y étaler le film autoradiographique, une surface de section aussi lisse que possible.

Voici comment on y est parvenu. L'extrémité inférieure du tibia d'un homme de 38 ans a été débitée à la scie à ruban en tranches sagittales de quelques millimètres d'épaisseur. Chacune des tranches a été enrobée au méthacrylate de méthyle. Après polymérisation de cette substance, le bloc obtenu a été limé parallèlement à la surface de la pièce osseuse, de façon à emporter les travées les plus superficielles, peut-être abîmées par la scie, et à faire affleurer les travées profondes, intactes. La surface limée a été aplanie au papier-émeri de plus en plus fin puis polie sur drap de billard aspergé d'hydroxyde d'alumine.

[1] Recherches aidées par l'Institut interuniversitaire des Sciences nucléaires et par le Fonds national de la Recherche scientifique de Belgique.

[2] R. Amprino et A. Engström, Boll. Soc. ital. Biol. sper. *26*, 148 (1950); Acta Anat. *15*, 1 (1952). – B. Engfeldt, A. Engström et R. Zetterström, Biochim. Biophys. Acta *8*, 375 (1952). – R. Amprino, Z. Zellforschung *37*, 144 (1952).

[3] R. Amprino, Exper. *8*, 20 (1952); Z. Zellforschung *37*, 240 (1952).

La préparation a été baignée pendant 12 h dans une solution de $CaCl_2$ contenant, par 100 cm³, 10 mg de calcium et 400 microcuries de Ca^{45} (fourni par l'U.S. Atomic Energy Commission). La surface à étudier a été enfin recouverte d'une émulsion sensible (Eastman Kodak autoradiographic stripping film) qui a été développée après 48 h.

La technique mise en œuvre assurant un contact immédiat entre l'émulsion et les surfaces osseuses devenues radioactives, on obtient une autoradiographie dont la résolution est satisfaisante. La figure ci-jointe est caractéristique: les surfaces de section des travées osseuses marquent en gris et sont bordées çà et là d'un liséré noir. Si l'on compare cet aspect à celui des travées elles-mêmes, examinées au microscope, on constate que la radioactivité intense appartient aux lamelles osseuses de dernière formation.

D'autre part, la microradiographie nous apprend[1] que les lamelles récentes sont moins calcifiées que les anciennes, malgré une structure histologique apparemment identique.

La notion acquise par l'étude du tissu osseux compact doit donc être étendue au tissu osseux spongieux: ce sont les parties les plus jeunes et les moins calcifiées de l'os spongieux qui fixent le plus avidement le radiocalcium *in vitro*.

P. Lacroix

Institut d'anatomie, Université de Louvain, Belgique, le 30 juillet 1952.

Summary

Embedding of cancellous bone in an acrylic resin is a suitable technique for radioautographic studies on this brittle tissue.

The fixation of radiocalcium by cancellous bone *in vitro* occurs mainly on the newly deposited lamellae.

[1] R. Amprino (communication personnelle, juin 1952).

Action de la thyroxine, du propylthiouracile et de la thyroïdectomie sur les acides nucléiques de la rate

Les relations entre le corps thyroïde et la morphologie de la rate ont été étudiées par divers auteurs[1] et les conclusions sont loin d'être concordantes. Il nous a semblé intéressant d'examiner un aspect biochimique de l'influence du corps thyroïde sur la rate en étudiant les variations quantitatives des acides pentosenucléique (A.P.N.) et désoxypentosenucléique (A.D.N.) à la suite d'administration de thyroxine, d'un antithyroïdien de synthèse, le propylthiouracile et après thyroïdectomie. C'est qu'en effet, à la suite de Brachet[2], Caspersson[3], Davidson[4], Mirsky[5], Boivin[6] et de nos propres recherches[7], nous croyons judicieux de considérer l'A.P.N.

[1] I. Sciaky, Ann. Anat. path. et Anat. norm. *15*, 165 (1938). – F. S. Daft, A. Kornberg, L. L. Ashburn et W. H. Sebrell, Soc. exp. Biol. Med. *61*, 15 (1946). – F. Layani, A. Aschkenasy et J. Mignot, Ann. Endocr. *8*, 205 (1947).

[2] J. Brachet, Cold Spring Harbor Sympos. quant. Biol. *12*, 18 (1947).

[3] T. Caspersson, Symp. Soc. Exp. Biol. *1*, 127 (1947).

[4] J. N. Davidson, Cold Spring Harbor Sympos. quant. Biol. *12*, 50 (1947).

[5] A. E. Mirsky J. Gen. Physiol. *31*, 1, 7 (1947).

[6] A. Boivin, Rev. Canad. Biol. *7*, 368 (1948).

[7] P. Mandel, L. Mandel et M. Jacob, C. r. Acad. Sci. *226*, 2019 (1948). – P. Mandel, M. Jacob et L. Mandel, J. Physiol. *42*, 662 (1950). – P. Mandel, L. Mandel et M. Jacob, C. r. Soc. Biol. *145*, 1231 (1950).

comme représentant biochimique qualifié du cytoplasme et l'A.D.N. comme celui des noyaux.

Nos essais ont porté sur un total de 72 rats groupés en 12 lots. Dans chaque lot, les animaux étaient du même âge et du même sexe et provenaient d'une même portée issue de croisements entre frères et sœurs à travers plusieurs générations. Les diverses portées comportaient de ce fait des individus dont les organes avaient une constitution chimique voisine; il en était de même pour la quantité absolue d'A.P.N. et d'A.D.N. de leur rate. Dans une première série de 5 lots, 16 sujets ont servi de témoins et 20 ont reçu des injections de thyroxine à raison de 1 mg par jour pendant 15 jours. Dans une seconde série de 5 lots également, 11 rats ont servi de témoins et 13 autres ont reçu du propylthiouracile dans leur nourriture à raison de 12,5 mg par jour pendant 15 jours. Enfin, dans une troisième série de 2 lots, 5 sujets ont servi de témoins et 7 ont subi une thyroïdectomie. Les sujets thyroïdectomisés ainsi que leurs témoins ont été sacrifiés au bout de 4 mois. Il importe de noter que dans chaque lot, correspondant à une portée de 5 à 6 rats, 2 à 3 sujets ont servi de témoins, les autres ont subi l'un des traitements indiqués. Les animaux ont été sacrifiés par saignée, l'azote protéique déterminé par la méthode de KJELDAHL, les acides nucléiques par les techniques de SCHMIDT et THANNHAUSER et de SCHNEIDER selon les principes indiqués antérieurement[1].

Les résultats de nos essais sont consignés dans les graphiques ci-joint. On y trouvera les moyennes concernant tous les témoins et animaux traités de chaque type d'expérience.

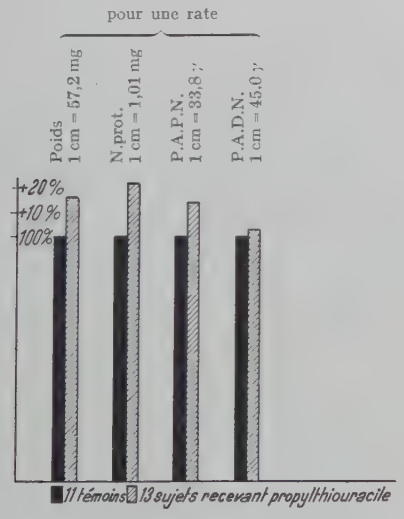


Fig. 1. Action du propylthiouracile sur le poids, l'N protéique, le P des acides pentose et désoxypentosenucléique de la rate. Colonnes noires: moyenne des témoins. Colonnes hachurées: moyenne des sujets ayant reçu du propylthiouracile.

Graphiques

Les valeurs concernant les témoins sont indiquées uniformément par des colonnes pleines de 100 mm de hauteur, celles répondant aux sujets ayant subi les divers traitements par des colonnes hachurées. On trouvera au-dessus des colonnes l'échelle adoptée permettant de retrouver les données expérimentales. Cette présentation permet de reconnaître directement sur le graphique les différences en pour-cent. Notons que l'inégalité des valeurs relevées chez les témoins répond aux différences d'âge et de sexe des divers lots d'animaux. C'est d'ailleurs la raison pour laquelle nous avons groupé les

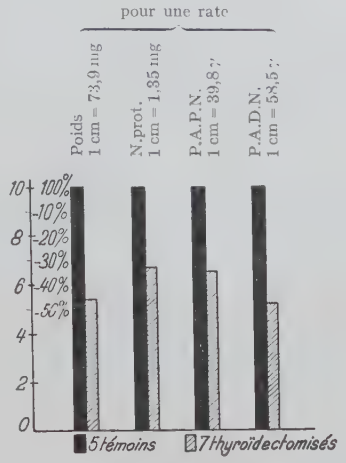


Fig. 2. Effet de la thyroïdectomie sur le poids, l'N protéique, le P des acides pentosenucléique et désoxypentosenucléique de la rate. Colonnes noires: moyenne des témoins. Colonnes hachurées: moyenne des sujets thyroïdectomisés.

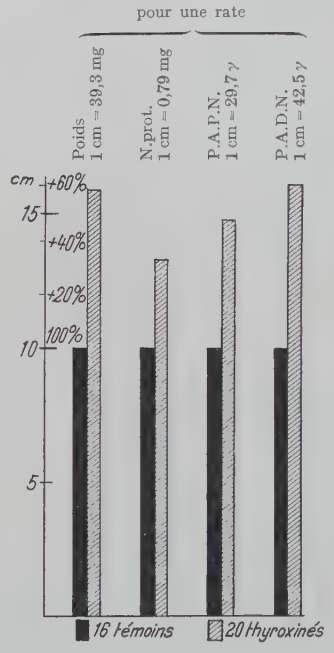


Fig. 3. Action de la thyroxine sur le poids, l'N protéique, le P des acides pentose et désoxypentosenucléiques de la rate. Colonnes noires: moyenne des témoins. Colonnes hachurées: moyenne des sujets ayant reçu de la thyroxine.

animaux par portées et comparé uniquement des sujets témoins et traités appartenant à une même portée.

L'examen des graphiques nous révèle que la thyroxine provoque un accroissement du poids de la rate, de l'azote protéique et du phosphore des acides pentose et désoxypentosenucléique. Les variations quantitatives des acides nucléiques traduisent une augmentation de l'ordre de 50% du cytoplasme et des noyaux.

La thyroïdectomie entraîne des modifications diamétralement opposées, à savoir diminution du poids de la rate, de l'azote protéique, ainsi que de l'A.P.N. et de l'A.D.N. oscillant entre 35 et 48%.

[1] P. MANDEL, M. JACOB et L. MANDEL, Bull. Soc. Chim. Biol. *32*, 80 (1950).

L'administration de propylthiouracile pendant une période de 15 jours est suivie d'un léger accroissement du poids, de l'azote protéique et de l'A.P.N. alors que l'A.D.N. reste sensiblement invariable. Il y a lieu d'admettre, dans ce cas, tout au plus un accroissement de la masse cytoplasmique.

L. Mandel, M. Jacob et P. Mandel

Institut de chimie biologique, Faculté de médecine, Université de Strasbourg, le 10 juillet 1952.

Zusammenfassung

Die Milz reichert sich nach Einwirkung von Schilddrüsenhormon an beiden Nukleinsäuren an. Dies zeigt sowohl eine Zunahme des aktiven Zytoplasmas sowie der Zellkerne an. Während derselben Versuchsdauer bewirkt Propylthiourazil eine leichte Zunahme des aktiven Zytoplasmas. Die Wirkung der Thyroidektomie ist derjenigen des Schilddrüsenhormones entgegengesetzt. Die Schilddrüsenhormone und die Thyroidektomie scheinen sich besonders auf die Desoxypentosenukleinsäure auszuwirken.

Sur la L-aminoacideoxydase de nombreux invertébrés marins

L'analyse chromatographique sur papier d'extraits d'organes provenant de multiples invertébrés marins (mollusques, crustacés, annélides, géphyriens, échinodermes) a montré que les tissus de la plupart de ces animaux renferment de l'arginine associée aux acides δ-guanido-α-cétovalérianique et γ-guanidobutyrique[1]. La présence de ces corps paraît devoir être reliée à un type de métabolisme de l'arginine différent de celui auquel participe l'arginase chez de nombreux vertébrés. Les homogénéisats d'hépatopancréas de moule (*Mytilus edulis* L.) oxydent en effet cet acide aminé en donnant naissance successivement à l'acide δ-guanido-α-cétovalérianique, à un corps intermédiaire non encore défini, et à l'acide γ-guanidobutyrique[1]. La L-aminoacideoxydase étant sans action sur l'arginine dans les tissus des vertébrés supérieurs[2], il convenait de rechercher si elle présente des caractères particuliers chez les invertébrés, comme on l'a déjà observé dans les venins des reptiles (L-ophioaminoacideoxydase)[3]. Le but de cette note est de résumer le travail que nous avons poursuivi à ce sujet sur des organes de divers animaux marins.

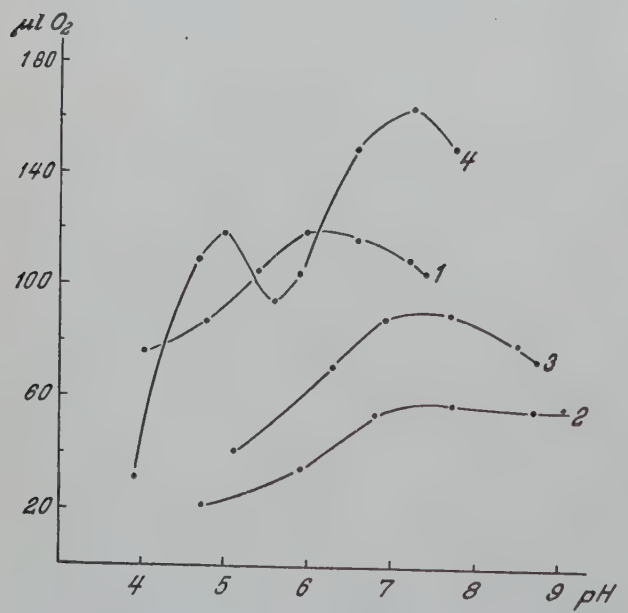


Fig. 1. Oxydation en fonction du pH de la L(+) arginine par des préparations d'hépatopancréas de 1° *Sepia officinalis* L., 2° *Aplysia* sp., 3° de tractus intestinal de *Paracentrotus lividus* Lmk, 4° *Marthasterias glacialis* L. Abcisses: pH; Ordonnées: μl O_2 fixés.

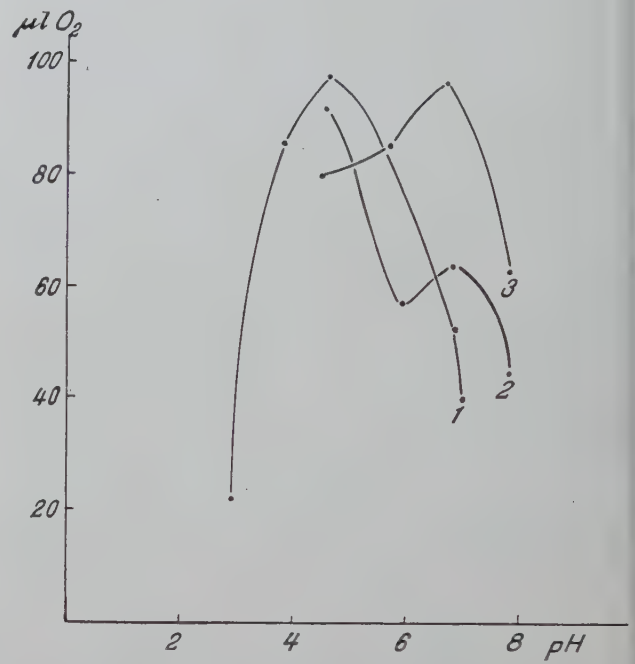


Fig. 2. Oxydation de la L(+)-arginine en fonction du pH par des préparations d'hépatopancréas de *Mytilus edulis* L. en l'absence (courbes 1 et 2) ou en la présence de N_3Na (courbe 3). Abcisses: pH; Ordonnées: μl O_2 fixés.

L'hépatopancréas (*Mytilus edulis* L., *Sepia officinalis* L., *Aplysia* sp.) ou le tractus digestif (*Paracentrotus lividus* Lmk., *Marthasterias glacialis* L.), broyés en présence d'un volume et demi d'eau distillée (waring blendor) ont été centrifugés pendant 15 à 20 min à 18000 t./min et l'on a répété deux fois cette opération. Le résidu des lavages renferme l'enzyme. Il a été mis en suspension dans de l'eau et l'on a étudié son activité oxydasique vis-à-vis de l'arginine et de divers acides aminés, en mesurant au moyen de l'appareil de Warburg l'oxygène consommé par le milieu suivant: 0,3 ml de solution 0,5 *M* de mélange tampon de phosphates alcalins ou acéto-acétique de divers pH + 0,3 ml de substrat 0,1 *M* + 0,5 ml de suspension d'enzyme + eau distillée, q.s.p. 2,9 ml (fioles de Warburg garnies de 0,1 ml de potasse à 20%, mesures faites après 10 min d'oxygénation). Des essais ont été poursuivis à des pH compris entre 2,9 et 9,1, en la présence ou en l'absence d'azide de sodium 0,01 *M*. Les résultats obtenus en prenant l'arginine comme substrat de l'oxydation ont permis d'établir des courbes dont les figures 1 et 2 donnent des exemples.

[1] Le cas de nombreux annélides présente des particularités sur lesquelles nous reviendrons avec I. Garcia.

[1] Ces données ont été établies au cours de recherches dont les résultats paraîtront prochainement [J. Roche, Nguyen-van Thoai, y. Robin, Biochim. Biophys. Acta (sous presse)].

[2] M. Blanchard, D. E. Green, V. Novito et S. Ratner, J. Biol. Chem. *155*, 421 (1944); *161*, 583 (1945).

[3] E. A. Zeller, A. Maritz et B. Iselin, Helv. chim. Acta *28*, 1615 (1945).

Le pH optimum de l'action enzymatique est le plus souvent voisin de 6,8 à 7,2 (courbes 2 et 3, fig. 1), comme celui de la L-ophioaminoacideoxydase. Dans certains cas, un second pH optimum se manifeste vers pH 5,0 (courbe 2, fig. 2) ou 6,0 (courbe 1, fig. 1). Ces discordances sont dues à l'interférence d'une action catalasique dont l'inhibition par l'azide de sodium (courbe 3, fig. 2) rétablit un pH optimum unique de l'oxydation de l'arginine, à pH 6,8 à 7,2. L'inhibition de la catalase étant plus rapide aux pH inférieurs à 6,0, la consommation de l'oxygène apparaît alors, en effet, comme plus importante à ceux-ci, en raison du ralentissement de la dégradation des peroxydes.

Des essais analogues poursuivis sur le foie d'un téléostéen (*Mullus barbatus* L.) ont montré que l'extrait de cet organe n'oxyde pas l'arginine, tandis que ceux du foie d'un chélonien (*Thalassochelys caretta* L.) et ceux d'un protochordé (*Glossobalanus sarniensis* Koehler) réalisent l'oxydation du même acide aminé.

Nous avons cherché à séparer l'enzyme par centrifugation fractionnée et par autolyse. Dans le premier cas, l'homogénéisat d'hépato-pancréas de moule a été lavé 4 fois à l'eau avec centrifugation de 10 min à 6000 t./min, puis 3 fois à 2000 t./min. Les eaux de lavage des trois dernières opérations ont été réunies et centrifugées 15 min à 6000 t./min; le culot obtenu, mis en suspension dans l'eau, présentait une activité oxydasique vis-à-vis de l'arginine se traduisant par la fixation de 10 μl O_2/h/mg. Il en est de même du résidu de digestion trypsique de l'homogénéisat d'hépato-pancréas (3 jours à 37°, pH 8,0, en présence d'1 % de trypsine non fractionnée), lavé à l'eau. Cette activité enzymatique est faible[1], mais présente des caractères constants d'une préparation à l'autre.

L'enzyme étudié n'est inhibé ni par les cyanures alcalins, ni par l'alcool octylique, ni par l'acide salicylique, alors que la L-aminoacideoxydase brute des mammifères l'est par les deux premiers. Ce dernier enzyme purifié[2] et celui des venins des serpents[3] sont également insensibles aux cyanures, mais le second est, en outre, inhibé par l'acide salicylique. La spécificité de la L-aminoacideoxydase des invertébrés étudiés et celle de l'enzyme des mammifères présentent des différences importantes. En prenant comme référence Q_{O_2}/h de son activité sur la L(+)-arginine (Q_{O_2}/h = 100), celle qu'elle exerce sur divers acides aminés présente les valeurs suivantes:

Glycocolle	0	L(−)-proline	0
L(−)-leucine	137	L(−)-histidine ...	120
DL-sérine	0	L(−)-ornithine ...	139
L(−)-tryptophane .	117	L(−)-citrulline ...	123
acide L(+)-glutamique	0	L(+)-arginine ...	100
acide L(−)-aspartique	0		

Contrairement à l'enzyme des mammifères, lequel oxyde la proline mais non l'arginine, l'ornithine et la lysine, la L-aminoacideoxydase des invertébrés étudiés dégrade les trois derniers acides aminés et la citrulline sans être active sur la proline. La L-ophioaminoacideoxydase présente à cet égard un comportement irrégulier, sauf en ce qui concerne la dégradation de l'arginine.

Les faits observés paraissent comporter une signification phylogénétique, en ce sens que de nombreux invertébrés renferment dans leur tractus digestif ou leur hépatopancréas une L-aminoacideoxydase active sur les acides aminés basiques. Enfin, la répartition de cet enzyme dans le règne animal est, dans une certaine mesure, parallèle à celle d'un type d'excrétion azotée à prédominance ammoniacale; en effet, nous n'avons pu mettre en évidence chez des vertébrés aucun des produits d'oxydation de l'arginine présents dans les tissus de nombreux invertébrés. L'hypothèse d'un rôle important et direct de l'action L-aminoacideoxydasique dans le déterminisme du type d'exrétion azotée de nombreux invertébrés, animaux en général ammoniotéliques, mérite donc d'être retenue.

J. Roche, Nguyen-van Thoai et P. E. Glahn

Laboratoire de biologie marine du Collège de France, Concarneau (Finistère), le 1er septembre 1952.

Summary

The tissues of numerous marine invertebrates of various zoological groups contain an L-aminoacidoxydase different to that of many vertebrates (apart from the L-ophioaminoacidoxydase). This enzyme acts on the basic amino acids, especially on arginine; it metabolizes the latter according to a process different to that common to vertebrates, based on arginase action. The presence of α-keto-δ-guanidovaleric and γ-guanidobutyric acids in the tissues of various invertebrates is due to this metabolic decomposition of arginine.

[1] Les préparations obtenues sont constituées par de minimes quantités de L-aminoacideoxydase fixées à de petits débris cellulaires; l'enzyme est en effet saturé par le substrat à des concentrations très faibles en celui-ci (0,0016 *M*).

[2] M. Blanchard, D. E. Green, V. Novito et S. Ratner, J. Biol. Chem. *155*, 421 (1944); *161*, 583 (1945).

[3] E. A. Zeller, A. Maritz et B. Iselin, Helv. chim. Acta *28*, 1615 (1945).

Inhibition of Fermentation by X-rays in Normal and Low Nitrogen Yeast[1]

Fermentation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae* was shown previously[2] to be interfered with by X-rays only when the yeast had been grown in a synthetic medium. When this strain of yeast was grown in nonsynthetic medium containing peptone and yeast extract, fermentation was not inhibited by doses up to 10^6 r. These results suggested that organic nitrogenous compounds were in some way able to protect fermentation enzymes from the action of X-rays. In the experiments reported here, yeast cultures were grown in synthetic media having different concentrations of $(NH_4)_2SO_4$ to obtain additional information concerning the factors which regulate the *in vivo* sensitivity of these enzymes to X-radiation.

The yeast was grown in the synthetic medium of Atkin *et al.*[3], which was modified by omitting the peptone and adding varying amounts of $(NH_4)_2SO_4$. The cells were washed in phosphate buffer (pH 4·5) and made up to standard density in the same buffer. Irradiation was carried out in pyrex test tubes with a therapy tube operated at 100 kV and 10 mA. The dose rate was between 1200 and 1300 r/min. After irradiation the cell suspensions were incubated for 3–4 h at 30°C. Fermentation of glucose was estimated by the standard War-

[1] Supported in part by a grant from the American Cancer Society recommended by the Committee on Growth of the National Research Council.

[2] F. G. Sherman and H. B. Chase, J. Cell. Comp. Physiol. *33*, 17 (1949); *34*, 207 (1949).

[3] L. Atkin, P. Gray, W. Moses, and M. Feinstein, Biochem. Biophys. Acta *3*, 692 (1949).

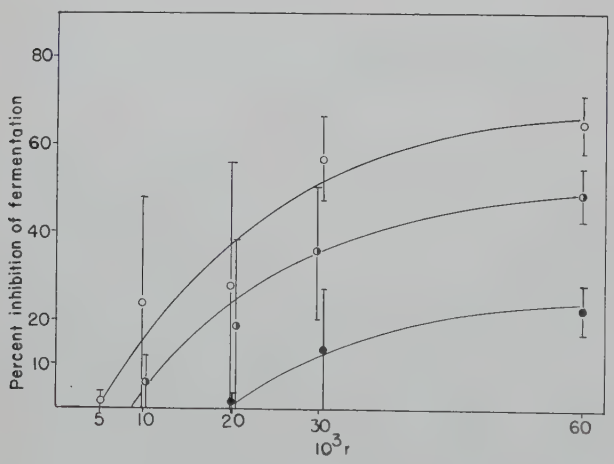
BURG manometric technique and the total nitrogen content of the cells determined by the micro-Kjeldahl method. Nonirradiated cell suspensions, otherwise treated exactly the same as the irradiated cell suspensions, served as controls.

When yeast cells are grown in a medium containing small amounts of ammonium sulfate the total nitrogen content of the cells and their ability to ferment glucose is markedly reduced (Table). It is of interest to note that the respiratory enzymes are not appreciably affected under these conditions.

Total nitrogen, $Q^{N}_{CO_2}$, and Q_{O_2} of *S. cerevisiae* grown in synthetic medium containing different amounts of $(NH_4)_2SO_4$

Conc. of $(NH_4)_2SO_4$ in medium g/l	Total N of yeast cells[1] %	$Q^{N_2}_{CO_2}$	Q_{O_2}
0·01	4·27±0·35	57	48
0·1	5·25±0·42	85	45
1·0	9·3 ±1·1	190	52

These data confirm DE LEY's[2] observations on *Escherichia coli* that the synthesis of the enzyme complex associated with glucose fermentation is dependent upon the amount of nitrogen available to the cells, whereas the respiratory enzymes are synthesized in preference to some other proteins.



Percent inhibition of fermentation at various doses of X-rays in yeast grown in media containing different amounts of $(NH_4)_2SO_4$. Open circles, half solid circles and solid circles refer to yeast grown in media containing 0·01, 0·1, and 1 g $(NH_4)_2SO_4$/liter respectively. The vertical lines give the range of variation observed.

The percentage inhibition of glucose fermentation at several doses of X-radiation is shown in the Figure for yeast grown in media containing different amounts of nitrogen. The intervals indicated give the range of values observed for six experiments at each dose level. In spite of the large variation between individual experiments at the lower dose levels, the data suggest that fermentation is inhibited by lower doses of X-radiation in low nitrogen yeast than in normal yeast. At the higher doses, the difference between normal and low nitrogen yeast is clearly indicated.

The experiments reported here may be explained in terms of the relative amount of irreparable damage to the fermentation enzymes. If the probability for an enzyme to be inactivated by a given dose of X-radiation is of the same order of magnitude in normal and low nitrogen yeast it is evident from the Table that a much larger fraction of the enzymes associated with fermentation will be inhibited in the low nitrogen yeast. The values observed for inhibition of fermentation at 30,000 and 60,000 r agree satisfactorily with those estimated on the basis that the fermentation enzymes have the same likelihood of being inactivated in normal and low nitrogen yeast. However, at dose levels of 10,000 and 20,000 r there is almost no measurable inhibition of fermentation by normal yeast, while in some experiments, at least, there is an appreciable inhibition in both groups of the low nitrogen yeast. These data suggest that the fermentation enzymes of low nitrogen yeast are more sensitive to the effects of X-rays than they are in normal yeast. If this is true, the argument advanced above in explanation of the experiments at 30,000 and 60,000 r appears to be inadequate. An acceptable explanation must take into account the fact that the sensitivity of these enzymes to X-rays is different in normal and low nitrogen yeast. The wide variety of chemical compounds which can protect against radiation effects[1], suggest that the normal yeast in these experiments may produce organic nitrogenous compounds in amounts sufficient to confer protection. This explanation would demand that these hypothetical protective agents are not able to be produced by low nitrogen yeast except in amounts too small to give protection. This concept is supported by the earlier observation from this laboratory[2] that the fermentation enzymes of yeast grown in medium containing peptone were not inactivated even by doses of X-radiation of 10^6r.

F. G. SHERMAN

Department of Biology, Brown University, Providence, Rhode Island, July 7, 1952.

Zusammenfassung

Hefezellen, die in einem synthetischen Substrat mit verschiedenen Mengen von $(NH_4)_2SO_4$ (mit Phosphatpuffer) kultiviert worden waren, wurden bestrahlt (100 kV Röntgenstrahlen). Darauf wurde die Gärung von Glukose manometrisch bestimmt. Die in einem wenig Stickstoff enthaltenden Milieu kultivierte Hefe hatte einen verminderten Stickstoffgehalt und ein erniedrigtes $Q^{N_2}_{CO_2}$. Die Gärung solcher Hefe war nach Einwirkung kleiner Strahlendosis geringer als die Gärung normaler Hefe. Das Gärungsvermögen von Hefe mit erniedrigtem Stickstoffgehalt wurde durch eine Strahlendosis von 30000 und 60000 r stärker herabgesetzt als die Gärung normaler Hefe.

[1] Calculated on a dry basis.

[2] J. DE LEY, Arch. Biochem. *20*, 251 (1949); *Over de fermenten van stickstof-arme Bacterium coli* (Doctoral thesis). Uit de Verhandelingen van de Koninklijke Vlaamse Academie voor Geneeskunde van België, 1949, XI. – No. 3 (Gent, 1949).

[1] Z. M. BACQ, Exper. *7*, 11 (1951). – A. HOLLAENDER, G. E. STAPLETON, and W. T. BURNETT, Ciba Foundation Conference on Isotopes in Biochemistry, 1951, pp. 96–109.

[2] F. G. SHERMAN and H. B. CHASE, J. Cell. Comp. Physiol. *33*, 17 (1949).

Respiratory Quotient, Heat Production and Blood Pyruvic Acid in Aneurin Deficient Rats after Glucose Administration

The determination of respiratory quotient (R.Q.) and metabolic rate is the most direct method of studying the oxidation processes and the glucide metabolism in aneurin deficient organisms. Nevertheless, the more or less severe starvation, which cannot be avoided in experimental avitaminosis, the difficulty of obtaining satisfactory measurements of heat production (H.P.) for the animals most frequently used in these experiments (rats, pigeons) and in estimating the degree of avitaminosis, and the frequent use of unsuitable diets deficient not only in aneurin but also in other B vitamins, are the most important disturbing factors which may explain the frequently contradictory results in this field. From the literature, we would refer especially to CHAHOVITCH[1], who noticed a decrease of the basal metabolic rate in avitaminosis B_1 (pigeon), and DRUMMOND and MARRIAN[2] according to whom the resting metabolism remains normal until the final phase, when marked malnutrition occurs. The R. Q. in avitaminosis B_1 has generally been found to be decreased[3]. MAGNE and SIMONNET[4] stated that the injection of glucose did not raise the R.Q. of the beri-beri pigeon, whereas MATTIL[5] found that the injection of cane sugar in vitamin B deficient rats immediately raised the R.Q. from 0·75 to 0·9 or more.

WHIPPLE, CHURCH and STEVENS[6] reported a decreased R.Q. in rats on aneurin-deficient diet; after subcutaneous injection of 1 g of glucose, the R.Q. were below the unity for deficient animals and above unity for controls.

More recently RING[7] confirmed the DRUMMOND and MARRIAN observations concerning the resting metabolism during avitaminosis; furthermore he found "no significant difference in the R.Q. of normally fed rats and those on thiamine deficient diets". In view of the discrepancy between the results reported in the literature, it seemed desirable to reinvestigate the problem under proper experimental conditions, determining the blood pyruvic acid as well as the R.Q. and the H.P.

In the present experiments we measured the H.P., the R.Q. and the blood pyruvate in normal and aneurin-deficient albino rats, taken from their cages in the morning without previous fast (not strictly basal conditions). The measurements were repeated after glucose administration *per os*. The heart rate, together with the body weight, has been used as a reliable index of the degree of avitaminosis.

The rats, with an initial weight of 55–70 g, were kept on a synthetic diet deficient in vitamin B_1 (wheat starch 65%, casein freed from fat and washed 18%, olive oil 10%, cod liver oil 2%, OSBORNE and MENDEL's saline mixture 5%), with appropriate quantities of other B vitamins (riboflavine, pyridoxine, niacine, pantothenic acid, biotin, inositol and choline). The control rats received, furthermore, 10 γ of aneurin hydrochloride each *pro die*.

All determinations have been carried out on animals fed in this way for 20–28 days. At the end of this time the rats were still in good physical condition, although avitaminosis was proved by the increased blood pyruvic acid, the decreased heart rate (about 23%) and the decreased body weight.

R.Q. and H.P. were determined on groups of 3 animals, kept for 10′ under a bell-shaped glass cover of known capacity. Air samples were analysed with the HALDANE-MARGARIA apparatus. The pyruvic acid was estimated by LU's method following FORNAROLI[1] on blood samples from rats kept in the dark for 30′–40′ before decapitation.

The glucose (1 g in 1 ml of water) was administered by means of sound. After administration the measurements were made between the 45th minute and the second hour for the R.Q. and H.P., and at the 45th minute for the pyruvic acid.

The results are reported in the Table

We note from the column *A* that the R.Q. and H.P. are significantly decreased during avitaminosis, whereas the blood pyruvic acid is considerably increased.

Glucose administration produces the following modifications:

(1) R. Q. is considerably increased. The difference between the values reached by the control rats and the avitaminotic rats is not statistically significant ($t = 0{\cdot}97$; $f.d. = 35$; $p = 0{\cdot}3$–$0{\cdot}4$). The increase due to the glucose administration was higher for the latter.

(2) H.P. is moderately but significantly increased both in control ($t = 2{\cdot}3$; $f.d. = 32$; $p = 0{\cdot}02$–$0{\cdot}05$) and in B_1 deficient rats.

(3) The blood pyruvic acid is also significantly increased both in the control rats ($t = 3{\cdot}2$; $f.d. = 25$; $p = 0{\cdot}001$–$0{\cdot}01$) and in the avitaminotic rats ($t = 3{\cdot}4$; $f.d. = 33$; $p = 0{\cdot}001$–$0{\cdot}01$). The difference between the two increases is not statistically significant.

The experiments reported in this paper show that the increase in R.Q. and H.P. after glucose administration in animals suffering from avitaminosis B_1, indicate an ability to use carbohydrate at a rate not lower than in controls.

The increase in the blood pyruvic acid after glucose administration in the avitaminotic animals is not significantly greater than in the controls. This result does not prove a diminished utilization of the glucides.

The lowered R.Q. and H.P. in aneurin-deficient rats can probably be explained only by a decreased food consumption. They are thus the manifestation of a partial fasting. Indeed it is known that anorexia is a precocious symptom of the avitaminosis B_1.

It is not easy to give a full explanation of our results at the present time in relation to present-day biochemical knowledge as to the point of attack of vitamin B_1 in the intermediate metabolism of carbohydrates.

Probably a great deal of importance must be given to the degree of avitaminosis, and therefore to the quantity of vitamin B_1 that still remains in the organism after treatment with a deficient diet.

Further researches are undoubtedly still necessary to clear up this point, and furthermore to demonstrate the

[1] X. CHAHOVITCH, Arch. Int. Physiol. *27*, 150 (1926).

[2] J. C. DRUMMOND and G. F. MARRIAN, Biochem. J. *20*, 1229 (1926).

[3] C. J. FARMER and H. E. REDENBAUGH, Amer. J. Physiol. *75*, 27 (1925).

[4] H. MAGNE and H. SIMONNET, Bull. Soc. Chim. biol. *4*, 419 (1922)

[5] H. A. MATTIL, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. *20*, 537 (1923); J. Biol. Chem. *55*, 717 (1923).

[6] D. U. WHIPPLE, C. F. CHURCH, and H. STEVENS, Amer. J. Med. Sci. *193*, 733 (1937).

[7] G. C. RING, Amer. J. Physiol. *148*, 51 (1947).

[1] P. FORNAROLI, Boll. Soc. ital. Biol. sper. *15*, 511 (1940).

	Rats	A Before administration			B After glucose administration		
		Number of determinations	Average	Standard deviation	Number of determinations	Average	Standard deviation
R.Q.	Controls	15	0·818 ± 0·010	± 0·042	19	0·936 ± 0·005	± 0·023
R.Q.	Avitaminosis	21	0·783 ± 0·007	± 0·0033	18	0·928 ± 0·006	± 0·026
Heat Produc. Cal/m²/hour	Controls	15	69·8 ± 1·90	± 7·4	19	75·1 ± 1·26	± 5·5
Heat Produc. Cal/m²/hour	Avitaminosis	20	58·1 ± 2·2	± 9·4	18	67·2 ± 1·97	± 9·4
Blood pyruvic acid mg/100 g	Controls	15	1·12 ± 0·075	± 0·291	12	1·55 ± 0·115	± 0·399
Blood pyruvic acid mg/100 g	Avitaminosis	25	2·38 ± 0·164	± 0·823	10	3·73 ± 0·471	± 1·493

degree of utilization of the carbohydrates in relation to the amount of aneurin in the tissues.

L. de Caro, C. Casella, and G. Rindi

Institute of Human Physiology, University of Pavia, November 30, 1951.

Sommario

1° La produzione calorica e il quoziente respiratorio in ratti in avitaminosi B_1 diminuisce significativamente rispetto ai controlli.

2° La somministrazione di glucosio per sonda (1 g) provoca nei ratti in avitaminosi e nei controlli un notevole aumento del Q.R., accompagnato da un innalzamento della produzione calorica,

3° L'aumento di piruvato nel sangue conseguente alla somministrazione di glucosio è modesto e per gli animali in avitaminosi non è statisticamente significativo.

4° Questi risultati dimostrano che i ratti in avitaminosi conservano una non diminuita capacità di utilizzazione dei glucidi; resta da chiarire fino a che punto questo comportamento sia legato al permanere nell'organismo di piccole quantità di avitamina B_1.

Hemmung subkortikal ausgelöster Krampfpotentiale durch β-Hexachlorcyclohexan

Bei der Untersuchung der neurotropen Eigenschaften einiger Hexachlorcyclohexane (α-, β-, γ-Isomere) am Warmblüter (Ratten) wurden krampfhindernde Wirkungen nachgewiesen, deren Dauer nach einmaliger Applikation mehrere Tage betrug und von keinem bisher bekannten Pharmakon mit ähnlicher Wirkungsart erreicht wurde[1]. Erhaltung der physiologischen Motilität, der normalen Temperaturregulation sowie unveränderte Funktion von Kreislauf und Atmung liessen darauf schliessen, dass die Nebenwirkungen bei den zur Erzielung der Krampfresistenz notwendigen Dosen des α- und β-Isomeren nur gering sein können[1]. Nur beim γ-Isomeren wurden vorübergehende initiale Krämpfe beobachtet, die für das Zustandekommen der antikonvulsiven Wirkung ohne Bedeutung sind. Die bisher gewonnenen Ergebnisse sprechen dafür, dass durch die Hexachlorcyclohexane im Stadium der Krampfresistenz eine eng umschriebene Funktionsänderung herbeigeführt wird, deren Existenz nur unter pathologischen Bedingungen durch das Ausbleiben experimenteller Krämpfe zu erkennen ist.

Durch einmalige Vorbehandlung der Versuchstiere mit den verschiedenen Isomeren liess sich eine Differenzierung der Wirkung von Krampfgiften erreichen, die mit den bisher üblichen Methoden nicht darzustellen war[2]. In Versuchen an dezerebrierten Ratten und bei Prüfung ihrer Rückenmarksreflexe konnte gezeigt werden, dass die Substrate für das Zustandekommen der krampfhindernden Wirkung im supratentorial gelegenen Vorderhirn lokalisiert sind. Es genügt schon die Abtragung einer Hemisphäre dieses Hirnanteiles, um den krampfhindernden Effekt zu beseitigen. Vorsichtige Durchschneidung der Kommissurenbahnen des Vorderhirns in der Mitte lässt dagegen die Behinderung der Krämpfe nach diesem Eingriff in vollem Umfange bestehen[2].

Zur weiteren Klärung des Angriffspunktes der Hexachlorcyclohexane haben wir elektro-enzephalographische Untersuchungen bei elektrisch und chemisch (Cardiazol) induzierten Reizzuständen des Gehirns durchgeführt. Bei diesen Untersuchungen interessierte uns hauptsächlich die β-Komponente, die generalisierte Krämpfe verschiedener Genese im Tierversuch beeinflusst[3].

[1] H. Herken, Ärztl. Wschr. *5*, 193 (1950); Arch. exper. Path. Pharmakol. *211*, 143 (1950).

[1] H. Herken, H. Kewitz und I. Klempau, Arch. exper. Path. Pharmakol. *215*, 217 (1952).

[2] H. Coper, H. Herken und I. Klempau, Naturwissenschaften *38*, 69 (1951).

[3] H. Kewitz und H. Reinert, Arch. exper. Path. Pharmakol. *215*, 93 (1952).

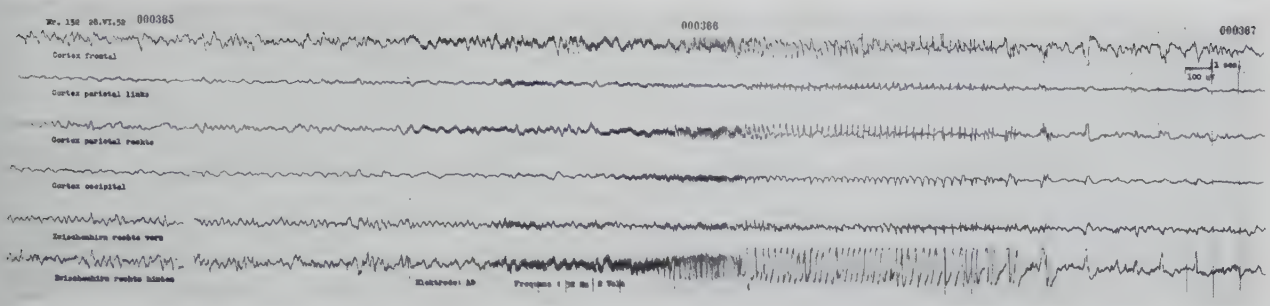


Abb. 1*a*. Reizversuch bei einem Kontrolltier. Krampfpotentiale bei 2 V.

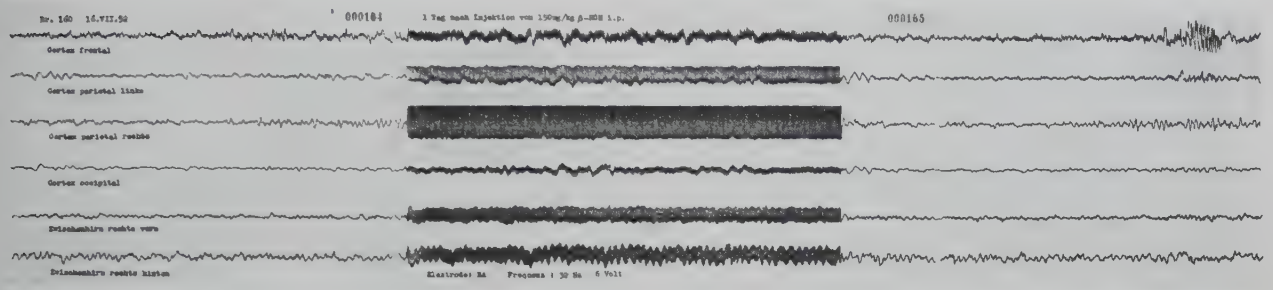


Abb. 1*b*. Reizversuch nach Vorbehandlung mit β-HCH. Auch bei 6 V keine Krampfpotentiale.

A. *Wirkung auf elektrisch induzierte Krämpfe.* Nach der Methode von MONNIER und LAUE[1] wurden Kaninchen von einer bestimmten epileptogenen Stelle des Subkortex in der Nähe des Archikortex unter definierten Bedingungen (Frequenz 32 Hz, Impulsdauer 7,5 ms, Spannung 2–4 V, Impuls gedämpft in Form eines Aktionspotentials) gereizt. Zur Ableitung der elektrischen Aktivität des Neokortex wurden Silberschrauben in die frontalen, parietalen und occipitalen Gebiete des Schädels bis zur Dura eingeschraubt. Die Registrierung der Aktionsströme erfolgte gleichzeitig durch tief implantierte Silberelektroden im Thalamusgebiet. Die elektrische Reizung der epileptogenen Hirnstelle bewirkte schon bei Anwendung von 2–3 V eine typische elektrische Krise bei 86% der normalen Kontrolltiere. Sie ist im EEG. gekennzeichnet durch eine salvenartige Entladung von Spitzenpotentialen (spikes) gegen Ende der Reizung und durch eine Serie von hohen Spitzen, spitzen Wellen (sharp waves) oder spike-and-wave-Komplexen nach Ende der Reizung (after effect). Diese Krampfpotentiale erschienen vor allem in den Zwischenhirnableitungen ohne motorische Erscheinungen (Abb. 1*a*). Diese Anfälle wurden von uns als Test zur Untersuchung der antikonvulsiven Wirkung des β-Hexachlorcyclohexans benutzt.

[1] M. MONNIER und H. LAUE, Helv. physiol. Acta (im Druck).

Tabelle I
Elektrische Reizversuche
mit subkortikal implantierten Reizelektroden

Zahl der Versuchstiere	β-HCH in mg/kg i.p. (ölige Lösung)	Zeitlicher Abstand zwischen HCH und elektrischer Reizung	Frequenz 32 Hz Imp.dauer 7,5 ms, steigende Spannung in Volt	Zahl der Tiere mit Krampfpotentialen
14	Kontrollen	—	2	5/14
			3	12/14
			4	14/14
2	150	3 bzw. 7 Stunden	2	1/2
			3	2/2
2	150	1 Tag	2	0/2
			3	0/2
			4	0/2
			6	0/2
4	150	3 Tage	2	0/4
			3	1/4
			4	1/4
			5	1/4
			6	4/4
4	150	6–8 Tage	2	0/4
			4	3/4
			6	4/4

Tabelle II
Versuche mit Cardiazol an Kaninchen
nach einmaliger Vorbehandlung mit dem β-Hexachlorcyclohexan

Zahl der Versuchstiere	β-HCH in mg/kg i. p. (ölige Lösung)	Zeitlicher Abstand zwischen HCH und Cardiazol in Tagen	Cardiazol in mg/kg intravenös	Generalisierter Krampf	Tod
6	Kontrollen	—	12–15	6	0
1	Kontrollen		20	1	1
1	150	3	20	0	0
4	100	4	20	1	0
2	150	6	20	0	0
1	150	7	20	0	0

Die Ergebnisse lassen eine deutliche Schutzwirkung des β-Isomeren gegenüber der elektrisch induzierten Krise erkennen. Die Wirkung erreicht 1 Tag nach der Injektion ihr Maximum. Zu diesem Zeitpunkt war auch bei Anwendung von 6 V keine Entladung von Krampfpotentialen zu erzielen (Abb. 1*b*). 3 Tage nach Applikation des Pharmakons ist die Krampfschwelle bei 3 Tieren immer noch deutlich erhöht. Am 6. bis 8. Tag wird die obere Grenze der Krampfschwelle für normale Tiere wieder erreicht. 1 Tier ist auch nach dieser Frist noch resistent.

B. *Wirkung auf Cardiazolkrämpfe:* Die Wirkung des β-Hexachlorcyclohexans gegenüber Cardiazol hält länger an, wie sich aus einem Vergleich mit den Werten der folgenden Tabelle ergibt.

6–7 Tage nach einmaliger Applikation des β-Isomeren ist noch eine deutliche Schutzwirkung gegenüber einer hundertprozentigen Krampfdosis Cardiazol elektroenzephalographisch und motorisch-symptomatisch nachweisbar.

Bei den krampfresistenten Tieren erlauben die Veränderungen im EEG. nach Cardiazolinjektion noch keine endgültigen Aussagen über den Angriffspunkt des chlorierten Kohlenwasserstoffs im Gehirn. Die Versuchsanordnung bei dem elektrischen Test lässt dagegen den Schluss zu, dass die β-Komponente des Hexachlorcyclohexans zu wesentlichen Änderungen der Reaktionsfähigkeit bestimmter Gebiete des Zwischenhirns (Thalamus) führt.

H. Herken[1], M. Monnier, H. Coper[1] und H. Laue

Laboratorium für angewandte Neurophysiologie, Genf, den 25. Juli 1952.

Summary

Treatment of rabbits with a single dosis of β-Hexachlorcyclohexane prevents, for many days, the apparition in the electro-encephalogramm, of seizure potentials induced by electrical stimulation of an epileptogenic brain area, as well as the apparition of Metrazol seizure potentials. The results of the electrical test showed that the β-component of the Hexachlorcyclohexane acts chiefly by changing the reactivity of definite diencephalic areas (Thalamus).

[1] Pharmakologisches Institut der Freien Universität Berlin, Berlin-Dahlem, Thielallee 69–73.

Besonderheiten der Reaktion des Herzens bei ungleicher Belastung seiner beiden Hälften

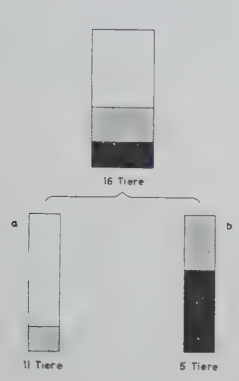
Beim Warmblüter werden bekanntlich an das rechte und an das linke Herz etwas verschiedene Anforderungen gestellt. Dies äussert sich zum Beispiel darin, dass der linke Ventrikel zur Erfüllung seiner mechanischen Aufgabe normalerweise einen Druck von etwa 120 mm Hg entfaltet, der rechte dagegen einen solchen von nur etwa 20 mm Hg. Dessenungeachtet darf man das Herz in mancher Hinsicht auch als ein *einheitliches* Organ betrachten, in welchem gerade auch die beiden Ventrikel sowohl über das Reizleitungssystem als auch über die gemeinsame muskuläre Scheidewand in engem gegenseitigem Kontakt stehen.

Wir möchten nun – als Arbeitshypothese – annehmen, dass die normalerweise bestehende Ungleichheit der Leistungen der beiden Herzhälften im Herzen als Ganzem verankert sei. Das heisst, das Herz dürfte gewissermassen daran gewöhnt sein, mit seiner linken und seiner rechten Hälfte eine in einem ganz bestimmten Verhältnis ungleiche Leistung zu vollbringen. Bei akuten schweren Kreislaufbelastungen andererseits wird sehr oft die eine Herzhälfte ungleich stärker beansprucht werden als die andere. Das normale Leistungsverhältnis rechts/links wird demnach gestört sein, und man kann sich dann fragen, ob diese Störung als solche auf die Suffizienzgrenze des Herzens von Einfluss ist. Mit andern Worten: Kann ein Herz eine starke, einseitige Belastung vielleicht besser überwinden, wenn gleichzeitig auch die andere Herzhälfte eine dem normalen Verhältnis entsprechende Mehrleistung zu vollbringen hat? Die nachstehenden Untersuchungen sollen einen ersten Beitrag zur Abklärung dieser Frage – und damit zur Frage der Berechtigung der Arbeitshypothese überhaupt – darstellen:

Versuchstiere waren etwa 2 kg schwere Kaninchen in Urethannarkose. Zur akuten, schweren Kreislaufbelastung erhielten sie während längstens 10 min eine intravenöse Infusion von Adrenalin, mit einer Geschwindigkeit von 25 γ je Kilogramm und Minute. Der Suffizienzzustand wurde an Hand des Elektrokardiogramms nach folgenden drei Graden (*O*, *A*, *F*) bewertet: Wurde die Belastung ohne irgendwelche Rhythmusstörungen ertragen, so war das Herz offenbar suffizient (*O*). Gehäufte Arrhythmien, wie Extrasystolie, Blockerscheinungen, Vorhofflimmern usw., wurden als beginnende (*A*), Kammerflimmern als vollständige Insuffizienz (*F*) betrachtet. Die Veränderung des normalen Leistungsverhältnisses rechts/links wurde dadurch erzwungen, dass wir wenige Sekunden vor Beginn der Adrenalinbelastung die beiden Herzhälften in ungleichem, aber kontrollierbarem Masse schädigten. Diese Vorschädigung bestand in einer dif-

fusen Mikro-Embolisierung des rechten oder linken Koronargefässgebietes. Durch einen Katheter, der von der Karotis aus bis an die Abgangsstelle der Koronararterien vorgeschoben war, wurden wasserunlösliche Kügelchen von 30 μ Durchmesser injiziert. Die erhaltene Embolisierung wurde nachträglich am toten Tier gemessen.

Die nachstehende Abbildung zeigt in ihrer oberen Hälfte die Ergebnisse von 16 Kaninchen, die – rechtes und linkes Herz zusammengenommen – eine mittlere Befalldichte von 2050 Emboli je Gramm Herz aufgewiesen haben. Davon haben 9 die Adrenalinbelastung reaktionslos ertragen; 4 haben mit schweren Arrhythmien und 3 mit Kammerflimmern reagiert.



Reaktion auf die Adrenalinbelastung bei vorgeschädigtem Herzen (in Prozenten der total verwendeten Tiere); Embolisierungsdichte etwa 2000 je Gramm Gesamtherz.

Weisse Flächen = reaktionslos ertragen (*O*); graue Flächen = gehäufte Arrhythmien (*A*); schwarze Flächen = Kammerflimmern (*F*).

Aufgeteilt nach
a) beide Herzhälften etwa gleich stark embolisiert,
b) beide Herzhälften deutlich verschieden stark embolisiert.

Ein mittlerer Befall von etwa 2000 je Gramm Gesamtherz stellt offenbar gerade etwa die Grenze dessen dar, was noch toleriert werden kann. Bei wesentlich stärkerem Befall nämlich wurde in keinem Falle mehr Reaktionslosigkeit (Typus *O*) beobachtet; bei wesentlich geringerem Befall dagegen kam es umgekehrt kaum je mehr zu Arrhythmien[1].

In der unteren Hälfte der Abbildung sind diese 16 Kaninchen gruppiert, je nachdem die beiden Herzhälften eher gleichstark (*a*) oder deutlich verschieden stark (*b*) embolisiert sind. Kleinere Unterschiede als 1:2 sind der Gruppe *a* (Mittel 1:1,5), grössere als 1:2 der Gruppe *b* (Mittel 1:4,2) zugeteilt. Die Aufteilung lässt erkennen, dass die Herzen – bei gleichem Gesamtbefall mit Kügelchen – die *ungleiche* Vorschädigung ihrer beiden Hälften *schlechter* toleriert haben. Dabei scheint gleichgültig zu sein, ob die rechte (2mal *A*; 1mal *F*) oder die linke Herzhälfte (2mal *F*) stärker befallen ist.

Das Ergebnis stellt zwar noch keinen eigentlichen Beweis für die eingangs aufgestellte Hypothese dar; dazu sind gewisse Annahmen, wie die «Gleichsetzung einer ungleichen Vorschädigung mit einer ungleichen Belastung» oder die «Bewertung des Suffizienzzustandes am Herzrhythmus» u.a.m., mit zu grossen Unsicherheiten behaftet. Es hat aber zumindest einmal gewisse Besonderheiten der Herztätigkeit aufgezeigt, die nach der Hypothese gut erklärbar wären. Das Problem wird zur Zeit an isolierten Herzpräparaten, deren rechte und linke Hälften getrennt Arbeit leisten, weiterverfolgt.

K. Bucher und M. Schär

Pharmakologische Anstalt der Universität, Basel, den 30. August 1952.

[1] Vide M. Schär: *Zum Mechanismus der Herzrhythmusstörungen nach Adrenalin*, Arch. int. Pharmacodyn (im Druck), in welcher Arbeit auch alle methodischen Einzelheiten aufzufinden sind.

Summary

Multiple micro-embolism in the coronary system of the rabbit heart–when this occurs to an unequal extent in the two halves–causes an especially pronounced fall in cardiac performance.

To explain this the hypothesis is suggested that the heart is accustomed to a certain relationship of performance between its right and left halves. Should the heart be forced to acute efforts because of an added burden on the circulatory system, thus disturbing the relationship between the two halves, this would be equivalent to an additional strain on the heart.

Histophysiology of the Pancreas in the Hibernating Hedgehog

The most typical physiological feature of a hibernating mammal is the change from homoiothermy to poikilothermy. As I have shown previously (Suomalainen[1]), artificial hibernation is produced in hedgehogs in summer by giving them injections of insulin and transferring the animals to a refrigerator. This artificial hibernation corresponds in all essential points to natural hibernation. These observations led to investigations into the histophysiology of the pancreas in the hedgehog.

In the hedgehog, the islets of Langerhans are very irregular and no connective tissue sheath is found round them (Suomalainen[2]). Thus the borderline between them and the exocrine tissue is often rather indefinite. The irregular form of the islets is especially clear during hibernation.

In a summer hedgehog awake, endocrine islet tissue comprises on the average 0·5 % of the area of the visual field in microscopic preparations, in the hibernating hedgehog on the average 1·3 %. Islet tissue is thus greatly hypertrophied during hibernation.

Ratio of α cells to β cells in the islets of Langerhans in the hedgehog.

		$\alpha:\beta$
Awake	June	1:3·3
Awake	September	1:4·9
Alloxan diabetes	September	1:1·1
Natural hibernation	December	1:6·2

The ratio of the α cells in the islets of Langerhans to the β cells was at first investigated with the various modifications of Bensley's and Gomori's methods (Suomalainen[3]). The results obtained were unreliable, however. Therefore the investigations were continued with the silver staining method of Gros-Schultze, modified by Wolter. The results are shown in the table, in

[1] P. Suomalainen, Nature *144*, 443 (1939); Ann. Acad. Sci. Fenn. [A] *53*, 7 (1939).
[2] P. Suomalainen, Sitz.-Ber. finn. Akad. Wiss. *1943*, 163 (1944).
[3] P. Suomalainen, Arch. Soc. "Vanamo" *5*, 35 (1950).

which each figure represents the mean of at least thirty islets of Langerhans.

In June when the animals are at the height of their activity, there are relatively numerous α cells. In September the relative number of β cells is already much greater, and in the hibernating animal there are nearly twice as many β cells as in summer. In alloxan diabetes, on the other hand, the relative number of β cells is reduced compared with the normal hedgehog.

Judging from the hypertrophy of the endocrine tissue of the pancreas and the relative increase in the number of β cells of the islets of Langerhans during natural hibernation, insulin secretion is greater than normal in hibernation. The hedgehog is also brought into artificial hibernation by injecting insulin into it and by putting the animal into a refrigerator.

The investigation will later be published in fuller detail in *Annales Academiae Scientiarum Fennicae*.

P. Suomalainen and Elsie Petri

Zoological Laboratory, Helsinki University, Helsinki, August 7, 1952.

Zusammenfassung

Das endokrine Inselgewebe des Pankreas ist beim Igel während des Winterschlafes stark hypertrophiert. In den Inseln selbst wiederum ist der relative Mengenanteil der β-Zellen im Winterschlaf gestiegen. Dies alles zeugt für gesteigerte Insulinsekretion während des Winterschlafes. Der Igel kann auch im Sommer in künstlichen Winterschlaf versetzt werden, indem man dem Tier Insulininjektionen gibt und es im Eisschrank hält.

Causes de la stérilité des souris femelles irradiées *in toto* et protégées par la cystinamine

La cystéinamine (ou β-mercaptoéthylamine: $HSCH^2-CH^2NH^2$) (1573 Labaz) et son dérivé oxydé, la cystinamine ou disulfure de bis-(β-aminoéthyle) (1591 Labaz), sont à l'heure actuelle les protecteurs les plus efficaces contre l'action mortelle des rayons X (Bacq et Herve[1]).

Les souris qui ont, à la faveur de l'intervention de l'une ou l'autre de ces amines soufrées, résisté à l'action d'une dose léthale de rayons X, présentent cependant d'importantes radio-lésions cytologiques. Betz[2], à propos de l'action protectrice du cyanure de potassium sur la léthalité des souris irradiées, a notamment signalé l'importance des altérations post-radiologiques immédiates que subit le tissu lymphoïde des animaux traités.

Nous avons pensé qu'il serait intéressant d'étudier, dans ce même ordre d'idées, le comportement des glandes génitales des souris protégées. On sait, en effet, que ces organes sont très altérés par une irradiation du corps entier; et tout récemment, Murphree, Whitaker, Wilding et Rust[3] ont démontré qu'une dose *in toto* de 100, 200 ou 300 r provoquait, chez les lapins mâles, une altération grave de leurs possibilités fécondantes; ces auteurs ont constaté que les accouplements de ces mâles irradiés à des femelles saines conduisaient à une mortalité fœtale de 32,7% contre 0% après expérience analogue menée avec les mâles-contrôles.

Les ovaires sont, eux aussi, extrêmement sensibles aux rayons X appliqués sur tout le corps; la dose de stérilisation qu'exige cette technique est assez mal connue et semble varier avec l'espèce animale étudiée; il est cependant probable qu'elle ne doit pas être très différente de la dose de stérilisation établie par irradiation de la seule sphère génitale; cette dernière dose est à la peau de 200 à 500 r pour la souris (Geller, 1930), de plus de 1800 r pour la rate (Fels[1]), et de 2500 r pour la lapine (Desaive[2]).

Observations personnelles. Le 4 décembre 1951, 30 souris C 57 noires, d'un poids standard de 20 g, protégées par une dose moyenne de 5 mg de cystinamine, sont irradiées en totalité à la dose (mortelle pour les souris non protégées) de 900 r, sous 250 kV, 12 MA, filtration de 0,25 cm de cuivre, distance focale de 50 cm, champ de 100 cm^2.

24 souris (soit 80% du lot) survivent à cette irradiation. A partir du 3 janvier 1952, les femelles survivantes de ce lot sont mises avec des mâles; aucune d'elle n'est devenue gravide.

Examen des souris stériles. Le 8 mai 1952, 5 de ces femelles sont sacrifiées; en même temps que deux femelles témoins qui ont reçu 5 mg de cystinamine et n'ont pas été irradiées. Nous notons en premier lieu que le pelage des irradiées est passé du noir au gris, phénomène habituellement observé chez les souris de cette race survivant à une irradiation massive.

L'autopsie ne révèle, par rapport aux témoins, aucune différence essentielle, sauf en ce qui concerne la sphère génitale; les ovaires sont, chez les irradiées, réduites à l'état d'un petit nodule ocré d'environ 2 mm de diamètre, noyé dans le tissu graisseux des paramètres; les trompes sont filiformes et les cornes utérines sont minces, pâles et déroulées.

Chez tous les animaux, témoins et irradiés, nous prélevons les ovaires, les trompes et les cornes utérines, le thymus, la rate, une surrénale et une thyroïde.

Analyse histologique des organes prélevés.

1° *Organes lymphoïdes.* La rate et le thymus des femelles irradiées sont d'aspect et de poids analogues à ceux des femelles témoins; nous n'avons décelé aucune atteinte microscopique de ces organes qui semblent avoir, après irradiation, récupéré entièrement leur activité.

2° *Tube digestif* (intestin grêle). L'épithélium villaire et les formations lymphoïdes sont intacts.

3° *Thyroïde.* La thyroïde des femelles irradiées est au repos et présente histologiquement le type macro-vésiculaire; chez les témoins la thyroïde semble plus active et est du type micro-vésiculaire.

4° *Surrénales.* Les surrénales des souris irradiées sont réduites en volume et présentent les caractéristiques histologiques d'un hypo-fonctionnement: zone glomérulée plus mince, zone fasciculée hypoplasiée, zone réticulée plus claire (voir fig. 1).

Dans l'ensemble, les surrénales des témoins (voir fig. 2) paraissent nettement plus actives. On sait d'ailleurs que l'atrophie cortico-surrénalienne est couramment observée chez les femelles castrées.

5° *Sphère génitale. a*) Chez les femelles témoins, *les ovaires* sont en pleine activité et riches en follicules de tous stades et en corps jaunes (voir fig. 3). *Les trompes*

[1] Z. Bacq et A. Herve, Bull. Acad. roy. Med. Belg. VIe série *17*, 13 (1952).

[2] H. Betz, C. r. Soc. Biol. *144*, 593 (1950).

[3] R. L. Murphree, W. M. Whitaker, J. L. Wilding et J. H. Rust, Science *115*, 709 (1952).

[1] E. Fels, Strahlentherapie *54*, 279 (1935).

[2] P. Desaive, Thèse d'agrégation, Arch. de Biol. *51*, 1 (1940).

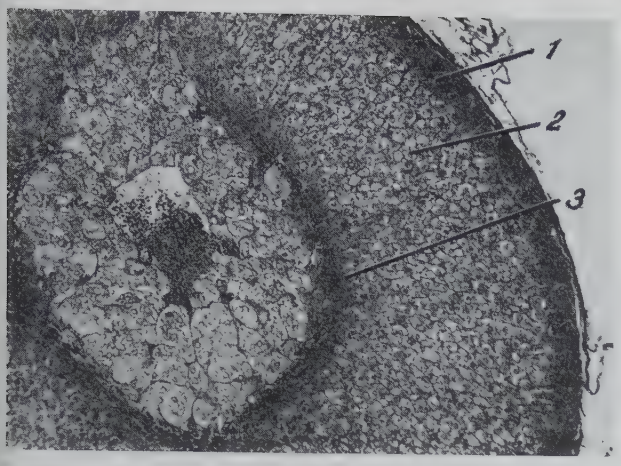


Fig. 1. *Surrénale irradiée* (grossissement × 130). *1* zone glomérulée indécise, *2* zone fasciculée hypoplasiée, *3* zone réticulée appauvrie.

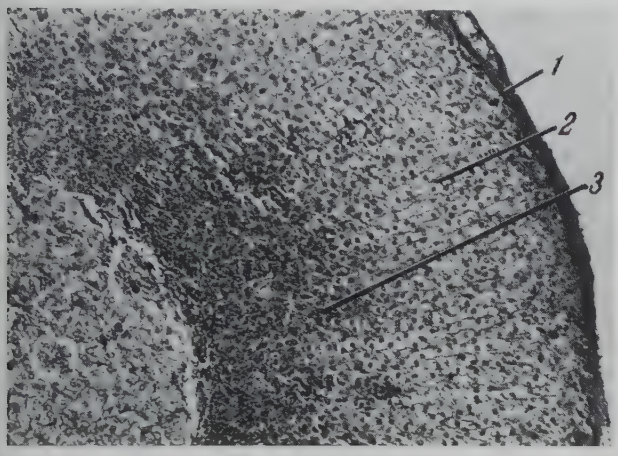


Fig. 2. *Surrénale témoin* (grossissement × 130). *1* zone glomérulée, *2* zone fasciculée, *3* zone réticulée.

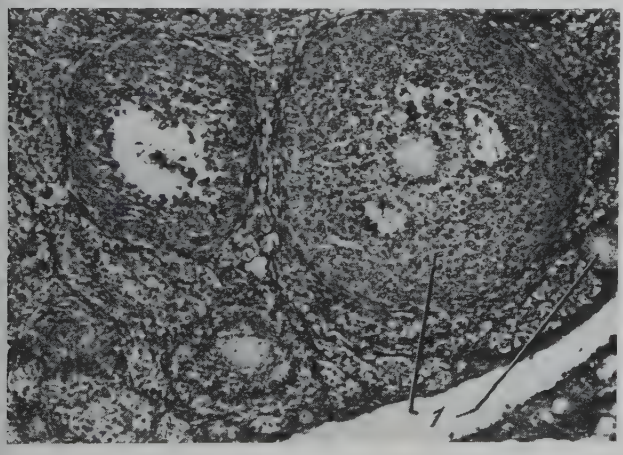


Fig. 3. *Ovaire témoin* (grossissement × 130). *1* follicule évolutif.

sont bien développées et montrent un épithélium cylindrique vibratil haut et actif. Les *cornes utérines* sont largement irriguées et leur cavité très irrégulière est bordée par un épithélium prismatique élevé. *b*) Chez les femelles irradiées, les *ovaires* (voir fig. 4) sont complètement dépourvus de follicules évolutifs et primordiaux; les restes ovocytaires sont envahis par des histiocytes; la glande fonctionnelle primitive est remplacée par un

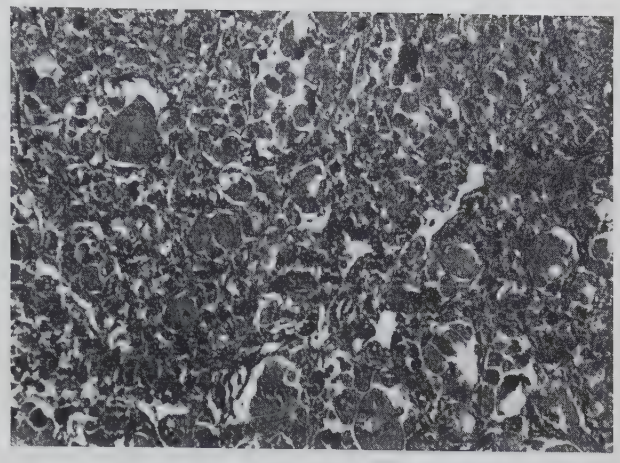


Fig. 4. *Ovaire irradié* (grossissement × 130). Atrésie complète des follicules.

amas cellulaire de remplissage issu des thèques des follicules atrétiques. *Les trompes* montrent encore quelques villosités, mais leur revêtement épithélial a une tendance à s'aplatir. Les *cornes utérines* sont pauvrement vascularisées; leur cavité s'est uniformisée et s'est nettement appauvrie en diverticules; l'épithélium bordant est moins élevé que chez les témoins, et repose sur un tissu sous-muqueux très atrophié.

Commentaires. L'irradiation *in toto* à 900 r chez des souris femelles protégées par la cystinamine entraîne la stérilité par destruction complète des ovaires; cette atrésie massive, apparaissant 5 mois après l'action des rayons X, en association avec l'absence absolue de tout follicule primordial résiduel, est la signature du caractère définitif de la stérilisation de l'animal.

La cystinamine, qui protège efficacement la vie des souris irradiées à 900 r et permet la récupération fonctionnelle des organes lymphoïdes de cet animal, n'est cependant pas capable d'éviter la dégénérescence complète et permanente des glandes génitales.

Ces constatations, valables pour la dose – mortelle sans protection – de 900 r, tiennent vraisemblablement au fait que cette application massive de 900 r dépasse largement, au niveau de l'ovaire, la dose stérilisante qui, d'après GELLER (1930), est, chez la souris, comprise entre 200 et 500 r.

Des recherches sont en cours, dans nos laboratoires, sur la protection éventuelle de l'ovaire, exercée par les amines soufrées, vis à vis des rayons X administrés sur la seule sphère génitale.

P. DESAIVE, Z. BACQ et A. HERVE

Centre national belge pour l'Etude de la Croissance normale et pathologique, Laboratoires de Pathologie chirurgicale, de Pathologie générale et de Radiothérapie de l'Université de Liège, le 9 août 1952.

Summary

The cystinamine (1591) Labaz which efficiently protects the life of mice irradiated with a lethal dose of 900 r, fatal for unprotected animals, and allows the complete recuperation of the lymphoïd tissues of these animals, is however unable to prevent ovarian atresia. This is probably due to the fact that this amount of 900 r greatly exceeds the sterilizing dose.

PRO EXPERIMENTIS

Methode zur biologischen Bestimmung des adrenokortikotropen Hormons

Es wird im allgemeinen die Meinung vertreten, dass die quantitative Bestimmung der ACTH-Aktivität nur bei solchen Tieren möglich ist, bei denen die störende Wirkung des endogenen ACTH ausgeschaltet wird[1]. Die Ausführung der Hypophysenexstirpation an einer grösseren Reihe von Tieren ist langwierig und schwerfällig. Deshalb suchten wir zur Bestimmung des ACTH ein einfacheres und schnelleres Verfahren auszuarbeiten, in dem wir die Wirkung des endogenen ACTH eliminieren.

Methodik: Für unsere Untersuchungen verwendeten wir weisse, männliche Ratten von 100–150 g Gewicht. Die Tiere wurden bei Zimmertemperatur gehalten und vor dem Versuch für drei Tage in einen Thermostat von 26° C gebracht. Zunächst wurden sie vorsichtig mit Äther und hierauf i. p. mit 0,12 g/kg Na-phenyläthylbarbiturikum narkotisiert; dann einzeln auf folgende Weise dekapitiert: Das Tier kam rücklings so auf ein Rattengestell zu liegen, dass der Kopf sich am Rande des Gestells befand. Am Hals wurde mit der Schere ein längsverlaufender, 2 cm langer Schnitt angelegt und derselbe ringsherum von der Haut entblösst. In der Mittellinie des Halses wurde die Trachea stumpf isoliert und eine die künstliche Atmung sichernde Kanüle eingebunden. Da wir gleichzeitig mit 4–5 Ratten arbeiteten, benützten wir zur künstlichen Atmung ein mit vier oder fünf Verzweigungen versehenes Röhrensystem. Nach der Einbindung der Kanüle wurde der Hals der Ratte schnell mit einer Hoffmann-Klammer abgeschnürt und ungefähr ½ cm oberhalb der Abschnürung der Kopf mit einer Schere abgeschnitten. 15 min nach der Dekapitation wurde die linke Nebenniere entfernt, gereinigt und, vor Austrocknung geschützt, mit 0,1 mg Genauigkeit auf der Torsionswaage gewogen und danach die zu untersuchende ACTH-Lösung in die Schwanzvene der Tiere eingespritzt. Dann wurden die Tiere in einen Thermostat von 36° C gebracht. Eine Stunde später nahmen wir sie einzeln aus dem Thermostat heraus, entfernten die rechte Nebenniere, die auch gereinigt und gewogen wurde. Im folgenden bestimmten wir den Vitamin-C-Gehalt der Nebenniere nach Roe und Kuether[2].

[1] G. Sayers, M. A. Sayers und M. Woodbury, Endocrinol. *43*, 379 (1948). – V. Klingmüller, Arzneimittel-Forschung *1*, 55 (1951).
[2] J. H. Roe und C. A. Kuether, J. Biol. Chem. *147*, 399 (1943).

Experimenteller Teil: Wir untersuchten zunächst, ob die Dekapitation als Alarmreaktion den Vitamin-C-Gehalt der Nebenniere beeinflusst.

Wenn an Ratten mit intakter Hypophyse die linke und eine Stunde später die rechte Nebenniere entfernt wird, nimmt bekanntlich der Vitamin-C-Gehalt der rechten Nebenniere infolge der Wirkung des endogenen ACTH im allgemeinen beträchtlich ab.

Nehmen wir die linke Nebenniere unmittelbar nach der Dekapitation heraus, so weicht ihr Vitamin-C-Gehalt von dem der Nebenniere normaler, narkotisierter Tiere nicht ab. Eine Stunde nach der Entfernung der linken Nebenniere ist der Vitamin-C-Gehalt der rechten Nebenniere nicht niedriger, sondern 19,0 ± 4,8 mg/100 g höher (11 Tiere) als in der linken Nebenniere. Wenn wir die erste Nebenniere erst ¼ Stunde und die zweite 75 min nach der Dekapitation entfernen, so zeigt der Vitamin-C-Gehalt nur eine kleine Abweichung. Der Vitamin-C-Gehalt der rechten Nebennieren ist, als Durchschnitt von 11 Tieren berechnet, um 6,5 ± 2,8 mg/100 g höher als der der linken Nebennieren. Das weist darauf hin, dass die entsprechend schnell, in 1–2 min, ausgeführte Dekapitation noch keine Mobilisation des endogenen ACTH verursacht. Wir führten im folgenden die Wertbestimmungen des ACTH derart aus, dass wir die linken Nebennieren – wie bei der Methodik beschrieben wurde – ¼ Stunde nach der Dekapitation entfernten.

Mit diesem Verfahren haben wir an 43 Tieren zwei Präparate verglichen. Die Resultate sind in der Tabelle dargestellt. Die Berechnungen wurden nach Sayers, Sayers und Woodbury[1] ausgeführt.

Unsere Methodik ist mit Berücksichtigung des Fehlers der relativen Aktivität ebenso genau wie die Methode von Sayers. Für die verschiedenen Versuchsgruppen von Sayers betrug die Fehlergrenze bei der das beste Resultat gebenden Gruppe 85–117%, mit der nach Munson[1] modifizierten Methode 61–163%, während sie bei uns 73–137% ausmachte.

Die Modifikation nach Munson vereinfacht den aus der Vitamin-C-Bestimmung bestehenden Teil der biologischen Wertmessung. Die oben beschriebene Methode vereinfacht den anderen Teil der Wertmessung: die Hypophysenexstirpation. Dadurch wird mehr Zeit erspart als mit der Munson-Modifikation. Das Verfahren gestattet, dass zwei Experimentatoren an 8–12 Tieren in

[1] G. Sayers, M. A. Sayers und M. Woodbury, Endocrinol. *43*, 379 (1948).

ACTH µg/100 g Armour ACTHAR (1 mg = 2 I. E.)	Abnahme des Vitamin-C-Gehaltes in mg/100 g zwischen der linken und rechten Nebenniere. Durchschnitt ±η (mittlere Fehler, Zahl der Tiere)	ACTH µg/100 g 1425/2/I	Abnahme des Vitamin-C-Gehaltes in mg/100 g zwischen der linken und rechten Nebenniere. Durchschnitt ±η (mittlere Fehler, Zahl der Tiere)
0,15	7,7± 7,1 (7)	Kontrollgruppe	−6,5± 2,8 (11)
0,21	36,2±14,8 (7)	0,5	33,6±15,3 (7)
0,30	94,0±18,7 (7)	1,0	84,5±12,2 (7)
0,60	93,5 (4)	2,0	111,1 (4)

Armour ACTHAR:	1425/2/I:	Kombiniert:
b = 292	b = 165	b_e = 228
s = 37	s = 36,5	s = 36,8
λ = 0,127	λ = 0,221	λ = 0,162
M = 0,484		
S_M = 0,0624		

Relative Aktivität (R) = Armour ACTHAR/1425/2/I = 3,05
Fehlergrenze des R von 73 bis 137%.
Der Wert der relativen Aktivität (R) ist mit 95% Wahrscheinlichkeit zwischen 2,21–4,19.

einem Tag Untersuchungen ausführen, die bei Hypophysenexstirpation, selbst bei vereinfachter Vitamin-C-Bestimmung, mehrere Tage in Anspruch nehmen würden. Gleichzeitig ist die Fehlergrenze der Methode nicht grösser als bei der Sayers- und Sayers-Munson-Methode.

Zusammenfassung

Wir arbeiteten eine Methodik zur biologischen Wertmessung des ACTH aus. Die Versuche wurden an Ratten ausgeführt, die wir an Stelle einer Hypophysenexstirpation vor dem Versuch in der oben beschriebenen Weise dekapitierten und mit künstlicher Atmung am Leben erhielten. Gemessen wird der Unterschied im Vitamin-C-Gehalt der linken und rechten Nebenniere, der durch die Wirkung von intravenös verabfolgtem ACTH zustande kommt. Es wurden zwei Präparate an 43 Tieren miteinander verglichen. Auf Injektion von 0,15, 0,21 und 0,30 μ g/100 g Armour ACTHAR (1 mg = 2,0 I. E.) nimmt der Vitamin-C-Gehalt in der rechten Nebenniere um 7,7, 47,8 und 94,0 mg/100 g ab. Die Wirkung ist dem Logarithmus der Dosen linear proportional. Die statistische Bearbeitung der Ergebnisse zeigte, dass die Methode ebenso genau ist wie die von SAYERS.

Die Methodik ist wesentlich einfacher und nimmt ungefähr die Hälfte der Zeit in Anspruch, die die bisher zur Wertmessung üblichen Verfahren benötigten. Weitere Ergebnisse werden in Acta Physiol. Hung. erscheinen.

L. GYERMEK

Forschungsinstitut der pharmazeutischen Industrie, Budapest, den 15. Mai 1952.

Summary

A simplified method for the biological determination of ACTH is described. The method is comparable to that of SAYERS as regards exactness, but requires only half the time.

Nouveaux livres - Buchbesprechungen - Recensioni - Reviews

Mathematics of Relativity

By G. Y. RAINICH

173 pages
(John Wiley & Sons, Inc., New York, 1950) ($3.50)

Der Verfasser gibt auf dem Umschlagblatt, im Vorwort und im Nachwort seine Auffassung davon an, welche Rolle der mathematischen Theorie einer physikalischen Erfahrung zukomme: dass nämlich eine solche Theorie dann brauchbar sei, wenn sie innerhalb der Fehlergrenze mit der Erfahrung übereinstimmende Resultate zeige. Da die Vorstellung *a priori* dann keine Rolle spielt, ist es auf diese Weise möglich, mit der Relativitätstheorie anzufangen und mit dem Experiment aufzuhören. Wir können uns denken, dass höhere Wesen, die nicht an unsere Raum- und Zeitvorstellung gebunden sind, auf diese Weise unsere Vorstellungswelt betrachten. Für uns Menschen ist es einigermassen erstaunlich, wenn der Versuch von MICHELSON und MORLEY erst auf S. 84, und auch dort nur in einem Nebensatz, erwähnt wird und es der relativistischen Diskussion des Begriffs der Gleichzeitigkeit ebenso geht (S. 88: "There are other modifications that have attracted a great deal of popular attention, owing to their sensational and paradoxical nature which we only mention").

Inhaltlich deckt sich das Buch einigermassen mit EINSTEINS *Stafford Little Lectures* bzw. *The Meaning of Relativily*, Methuen, London 1922–1951.

K.-F. MOPPERT

Allgemeine und anorganische Chemie

Von A. ROEDIG
3. Auflage, 288 Seiten
(Hans-Ferdinand-Schulz-Verlag, Freiburg i. Br. 1948)

Unter den kurzgefassten Lernbüchern der allgemeinen und anorganischen Chemie für Mediziner ist dieses Werk eines der besten. In den ersten Kapiteln gelingt dem Verfasser eine geschlossene Darstellung der allgemeinen Chemie mit besonderer Betonung der physikalischen Grundlagen. Ohne eine gewaltsame Trennung durchzuführen, behandelt er in den späteren Kapiteln die Systematik der Elemente und ihrer Verbindungen. Die bewusst kurze und prägnante Formulierung und besondere Hervorkehrung der wichtigen Tatsachen wird jeder Examenskandidat begrüssen.

In seinem Vorwort zur 3. Auflage hat der Verfasser eine tiefgreifende Umgestaltung für eine spätere Auflage angekündigt. Wenn ihm dabei eine Darstellung vom Standpunkt der modernen Atomtheorie, eine noch konsequentere Verknüpfung mit den physikalischen Grundlagen und eine noch mutigere Kürzung der Systematik gelingen sollte, so hätte er sich um die stiefmütterlich bearbeitete anorganische Chemie der Mediziner sehr verdient gemacht. Die Qualität der vorliegenden Auflage rechtfertigt alle Erwartungen.

A. RAMEL

Handbuch der anorganischen präparativen Chemie

Herausgegeben von GEORG BRAUER, unter Mitarbeit zahlreicher Fachgelehrter

8 Lieferungen zu 160 Seiten
(Verlag Ferdinand Enke, Stuttgart, 1948)
(Pro Band DM 20.–)

Was schon lange vermisst wurde, ist jetzt endlich im Erscheinen begriffen: ein Handbuch der präparativen anorganischen Chemie. Allerdings liegen erst zwei Lieferungen vor, doch zeigen diese zwei schon, dass hier ein neues Werk geschaffen wurde, welches allen Ansprüchen genügen dürfte. Obwohl das riesige Stoffgebiet, das Präparate aus der neuesten Zeit berücksichtigt, an viele

Mitarbeiter verteilt wurde, präsentiert sich das Werk in einer saubern, geschlossen-einheitlichen Darstellung. Was dem Praktiker angenehm auffällt, ist die übersichtliche Darstellung der verwendeten Apparaturen und Geräte, wobei teilweise sehr moderne Geräte aufgenommen wurden. Im Anschluss an jedes Präparat sind dessen Eigenschaften und ein Literaturverzeichnis darüber zu finden.

Präparate, die heutzutage im Handel leicht und genügend rein zu kaufen sind, wurden nicht beschrieben. Es wurden aber auch nicht Präparate, deren Darstellung mit grössten Schwierigkeiten verbunden sind, weggelassen, wie es leider in vielen Anleitungsbüchern gemacht wird.

Im Interesse einer noch sauberern Darstellung wäre es angebracht, grundsätzlich den Ionenzustand mit hochgestellten + und – zu bezeichnen, nicht die altertümliche Schreibweise mit Punkten und Kommata zu verwenden. (Teilweise im selben Satz nebeneinander zu finden!)

R. Mangold

Igneous and Metamorphic Petrology

By Francis J. Turner and Jean Verhoogen

602 pages, 92 figures, and 31 tables
(McGraw-Hill Book Company, Inc., New York, 1951)
($9.00)

In 22 Kapiteln werden die Hauptprobleme der metamorphen und magmatischen Gesteinsbildung einheitlich auf physikalisch-chemischer Basis unter wesentlicher Bezugnahme auf sorgfältige Feldbeobachtungen und unter Heranziehung einer Fülle von einschlägiger Literatur dargestellt.

In Kapitel 1 und 2 (zum Teil auch in Kapitel 13 und 16) werden, neben einer allgemeinen Einführung, die den folgenden Kapiteln zum Teil zugrunde liegenden thermodynamischen Grundlagen der metamorphen und magmatischen Gesteinsbildung vermittelt. Die Kapitel 3 bis 6 sind der Entstehung, dem Gleichgewicht, der Variationsbreite und Klassifikation der Intrusivgesteine gewidmet. Der Inhalt von Kapitel 7 bis 13 stellt eine Diskussion verschiedener vulkanischer und intrusiver Gesteinsvergesellschaftungen dar. In Kapitel 14 sind Umgebung, Ursprung und Entwicklung von Magmen diskutiert. Die Kapitel 15 bis 21 sind eine etwas gekürzte und kondensierte Wiedergabe der Geol. Soc. Amer. Memoir *30* (F. J. Turner, *Mineralogical and structural evolution of metamorphic rocks*, 1948). Das letzte Kapitel handelt von den Beziehungen der Metamorphose zu Magmen und zur Orogenese.

Das Buch ist für den Gebrauch durch Studenten, für die Forschung und den Unterricht gedacht. Es ist jedoch jedem praktizierenden Geologen sehr zu empfehlen. Es ist vor allem zu hoffen, dass es zum entscheidenden Agens werde gegen den Glauben, man könne aus einfachen Feldbeobachtungen ohne physikalisch-chemische Vorschulung auf alle möglichen Arten von Diffusions- und Umwandlungsprozessen schliessen.

Sehr wertvoll sind auch die zahlreichen Literaturangaben, die das Buch schon allein in jene höhere Klasse der Lehrbücher erheben, die dem Berufstätigen noch lange als Quelle dienen können.

Unter den kleinen Lücken, die zum Teil von den Autoren selbst zugegeben werden, dürften die beiden folgenden am spürbarsten sein: 1. Eine weitgehende Beschränkung der Literaturangaben auf Arbeiten des englischen Sprachgebietes. – 2. Der absichtliche Verzicht auf eine exakte Definition der Begriffe Gefüge, Textur und Struktur. Dieser Verzicht wird damit begründet: "...there is still no uniformity to such usage" (S. 55). Das diesbezüglich herrschende Durcheinander im englischen Sprachgebiet wird mitgemacht, indem die drei Begriffe «fabric», «structure» und «textur» willentlich synonym gebraucht werden. Die modernen, grundsätzlichen Vorschläge zur Vereinheitlichung (zum Beispiel von P. Niggli *et al.*) werden nicht erwähnt. – Der Verlag hat das Buch mit Sorgfalt und Geschick ausgestattet.

G. C. Amstutz

—

Biological Applications of Tracer Elements

Cold Spring Harbor Symposia on quantitative Biology

Vol. XIII. 222 and XI pages, 87 figures

(The Biological Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1948)
($7.–)

Die bereits internationale Reputation geniessenden *Cold Spring Harbor Symposia on quantitative Biology* bedürfen keiner besonderen Vorstellung und Empfehlung mehr. Der vorliegende 13. Band umfasst alle Vorträge samt vielen Diskussionsvoten, die im Sommer 1948 auf Grund der Parole «Biologische Anwendung der Isotope» unter der bewährten und liebenswürdigen organisatorischen Führung von M. Demerec gehalten wurden. Dass die eigentliche Zunft der Isotopefachleute biologischer Richtung versammelt war und zu Worte kam, ist aus den reichen Ergebnissen, welche aus den 25 Referaten hervorgehen, deutlich ersichtlich. Von G. Hevesy finden wir eine ausgezeichnete historische Übersicht zum Gesamtthema. H. G. Wood behandelt die Synthese des Leberglykogens als Ausdruck intermediären Stoffwechselgeschehens. Über Probleme des Lipoidstoffwechsels liegen Arbeiten von K. Bloch, S. Gurin und K. Bernhard vor, während G. Ehrenswärd Untersuchungen über N-Stoffwechsel in Torulopsis und D. M. Greenberg und Mitarbeiter solche über den Mechanismus der Proteinsynthese mitteilen. E. Hammarsten und Mitarbeiter und G. B. Brown berichten über Purinmetabolismus. Von D. Rittenberg liegt ein den Stoffwechsel des Glykokolls betreffender Aufsatz und von D. Shemin ein solcher über Biosynthese der Protoporphyrine vor. Probleme der Permeabilität behandeln L. B. Flexner und Mitarbeiter, J. Sacks und H. H. Ussing. Im weiteren werden Untersuchungen auf dem Gebiete des Mineralstoffwechsels mitgeteilt, so zum Beispiel von M. Kamen und S. Spiegelman über Phosphatstoffwechsel bestimmter Einzeller, von G. E. Burch und Mitarbeitern über Na^{22}-Ausscheidung bei Gesunden und Kranken. W. P. Norris und Mitarbeiter berichten über vergleichende Ra-, Sr- und Ca-Stoffwechseluntersuchungen, T. J. Arnason sprach über Chromosomenteilung unter dem Einfluss radioaktiven Phosphors. R. Bentley behandelt die Anwendung des O^{18}-Isotops und M. Calvin den Kreislauf des Kohlenstoffs bei der Photosynthese. H. Branson versucht, Stoffwechselsysteme einer mathematischen Behandlung zugänglich zu machen unter der Voraussetzung der Brauchbarkeit von Integralgleichungen bei Problemen der Isotope-Signierung. Weitere Beiträge stammen von D. L. Buchanan und Mitarbeitern und von S. F. Carson. Das Buch mit seinen zahlreichen Tabellen und Abbildun-

gen vermittelt in ausgezeichneter Weise einen Einblick in eines der wichtigsten Gebiete biologischer Forschung.

K. BERNHARD

E. Merck's Jahresbericht

über Neuerungen auf den Gebieten der Pharmakotherapie und Pharmazie

64. Jahrgang, 1950; 432 Seiten

(Darmstadt, Dezember 1951; Verlag Chemie GmbH., Weinheim)

Der «Jahresbericht» von E. MERCK braucht nicht besonders empfohlen zu werden. Jeder, der mit pharmakotherapeutischen oder pharmazeutischen Fragen zu tun hat, weiss, dass es etwas Gleichwertiges in der Literatur nicht gibt. In dieser Besprechung kann deshalb nur das dem Fachmann Bekannte unterstrichen werden. Aus dem nicht mehr übersehbaren Schrifttum ist im vorliegenden Band wieder das Wichtigste herausgegriffen und das Wesentliche vom Unwesentlichen abgesondert worden. Mit prägnanten Sätzen wird auf alle irgendwie bedeutsamen Arbeiten und Präparate eingegangen, gleichgültig, ob es sich um ganz aktuelle Dinge, wie Antibiotika, Cortison usw., oder um bestimmte Beobachtungen und Befunde handelt, die später einmal wichtig sein können. Der Leser dieser einzigartigen Zusammenstellung erkennt leicht, welche tatsächlichen Fortschritte im Berichtsjahr erzielt worden sind. Das Register der Arzneimittel und das Verzeichnis der Indikationen ist, wie gewohnt, präzis und ausführlich angelegt.

G. BOEHM

Cell Growth and Cell Function

By T. O. CASPERSSON

185 pages, 94 figures

(W. W. Norton & Co. Inc. New York, 1950)

Das vorliegende Buch gibt eine Übersicht über die am Karolinska-Institut in Stockholm im Laufe der letzten 15 Jahre durchgeführten zytochemischen Untersuchungen. Die vom Autor entwickelte Methode der Ultraviolett-Mikrospektrographie ermöglicht vollkommen neue Einblicke in die Prozesse des intrazellulären Eiweissstoffwechsels, welche für die gesamte Biologie von grosser Bedeutung sind. Nach einer einleitenden Besprechung der Methodik und ihrer Anwendung für die Erforschung der Proteine und Nukleotide werden an Hand zahlreicher Beispiele die wichtigsten Ergebnisse auf dem Gebiete der Kern- und Protoplasma-Bausteine dargestellt. Physiologische und pathologische Vorgänge in der Zelle finden ihr Abbild in quantitativ fassbaren chemischen Veränderungen. Besonders eindrucksvoll sind dabei die Befunde an Tumorzellen. Die äusserst klare, mit zahlreichen instruktiven Abbildungen belegte Darstellung vermittelt nicht nur dem Mediziner, sondern jedem biologisch interessierten Forscher wertvolle neue Erkenntnisse.

H. LÜDIN

The Care and Breeding of Laboratory Animals

By EDMOND J. FARRIS, Editor, and a staff of fifteen contributors

XV, 515 pages, 175 figures

(John Wiley & Sons, Inc., New York, Chapman and Hall, London, 1950)

Das Werk soll dem wissenschaftlich Arbeitenden ermöglichen, sich schnell über die Haltung und Zucht der wichtigsten Versuchstiere zu orientieren. In 14 Einzeldarstellungen werden zunächst die Vertreter der Wirbeltiere behandelt. Es schliessen sich je ein kurzes Kapitel über Drosophila und über die Kontrolle der Seuchen und Parasiten der Laboratoriumstiere an. Die einzelnen Abschnitte sind in der Art der Darstellung, im Umfang und in der Berücksichtigung verschiedener Arbeitsrichtungen sehr unterschiedlich. So werden über Maus (STRONG), Meerschweinchen (IBSEN), Kaninchen (SAWIN), Hund (WHITNEY), Frettchen (BISONETTE), Opossum (FARRIS) und Huhn (HUTT) nur allgemeine Hinweise zur Haltung, Züchtung, Markierung und Protokollierung gegeben und mit einigen Literaturangaben versehen. Besonders ausführliche methodische Darstellungen mit zahlreichen Einzeldaten liegen für den Rhesusaffen (VAN WAGENEN) und für die Ratte (FARRIS) vor. Bei der Behandlung des Rhesusaffen wird die Aufzucht isolierter Jungtiere und die dort häufige Tuberkulose berücksichtigt. Die Krankheiten und Parasiten von Ratte und Kaninchen werden besonders eingehend besprochen. Das Kapitel über den Goldhamster (POILEY) stellt eine Monographie über bisherige Wachstums- und Fortpflanzungsuntersuchungen an diesem Objekt dar und enthält ein ausführliches Literaturverzeichnis. Auch bei der Behandlung der Katze (DAWSON) liegt der Schwerpunkt auf einer Übersicht bisheriger Fortpflanzungs- und Sexualitätsuntersuchungen mit diesbezüglichen Literaturangaben. Im Abschnitt Reptilien (POPE) sind Schlangen, Eidechsen, Schildkröten und Krokodile getrennt bearbeitet; über Handhabung, Transport, Käfigung, Futter, Krankheiten und Fortpflanzung wird das Wichtigste gesagt. Die Darstellung der Amphibien ist zu kurz und entspricht nicht der Bedeutung dieser Tiergruppe in der modernen Biologie. Die Fortpflanzung und Aufzucht des Axolotls wird summarisch beschrieben, Xenopus nur als Testobjekt für Schwangerschaftsuntersuchungen genannt. Mehr als ein Fünftel des Buches nimmt die vorzügliche Bearbeitung der Fische als Versuchstiere ein (GORDON). Sie bietet alles hier Wissenswerte in knapper Form und enthält etwa 500 Literaturangaben aus allen Gebieten, auf denen mit Fischen gearbeitet wurde. – Das Werk füllt eine Lücke in der biologisch-methodischen Literatur aus.

H. QUERNER

Informations - Informationen - Informazioni - Notes

EXPLICATIONES

A Relationship between the Rate of Attaining Equilibrium and the Velocity Constant of the Reverse Reaction in certain Enzyme-Inhibitor Systems

The purpose of this communication is to point out a relationship based upon the law of mass action, which is applicable to a certain class of reversible reactions, yet is not apparent superficially and has not been formally stated heretofore.

It has recently been shown[1] that reversible cholinesterase inhibitors of a certain structure fall into a distinct group characterized by an unusually slow rate of reaction with the enzyme. The development of inhibition is slow (as first demonstrated by EASSON and STEDMAN[2]) and dissociation on dilution or on addition of substrate is equally slow. These observations raised the question whether there was any necessary parallelism between the rates of association and dissociation, and this led to a more general inquiry into the factors influencing the rate of attaining equilibrium in an enzyme-inhibitor system studied in the customary way.

Two peculiarities are encountered in the comparative study of reversible enzyme inhibitors. *First*, the investigator has little freedom in choosing their concentrations. If an effect is to be observed at all, one is forced (for reasons of accuracy) to measure *moderate* degrees of inhibition, i.e. to work somewhere in the middle portion of the inhibition curve. The available concentration range for any inhibitor will therefore depend upon its affinity for the enzyme; and as affinities may vary over many orders of magnitude, various inhibitors will commonly be employed at widely different concentrations. *Second*, what one measures is not the number of moles of a reaction product but rather the combination with inhibitor of a certain *fraction* of enzyme molecules. As a consequence of these two peculiar conditions, in systems of a certain type (defined below), a special physical significance can be attached to the rate of development of inhibition. Curiously, the whole course of the approach to equilibrium becomes dependent upon the velocity constant of *dissociation*.

For reversible inhibition, assuming one inhibitor molecule combines with a single enzyme center,

$$E + I \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} EI.$$

At equilibrium, *provided most inhibitor molecules remain free*,

$$\frac{(E_f)\,(I_f)}{(EI)} = \frac{k_2}{k_1} = K,$$

$$i = \frac{(EI)}{E_t}$$

$$I_t = I_f = K\,\frac{(EI)}{E_t - (EI)} = \frac{k_2}{k_1} \cdot \frac{i_e}{1 - i_e},$$

where i and i_e represent, respectively, the fractional inhibition in general, and at equilibrium; and E_f, I_f denote *free* and E_t, I_t *total* enzyme and inhibitor concentrations.

The condition that $I_f \cdot I_t$, namely that the enzyme does not bind an appreciable fraction of the inhibitor, is essential to all that follows. It applies in any case where the Michaelis constant, K, can be taken equal to the inhibitor concentration producing 50% inhibition. Such systems are defined by the ratio E_t/K, as pointed out elsewhere (zone *A* of STRAUS and GOLDSTEIN[1]), and are exceedingly common.

Now for the rate of development of inhibition,

$$\frac{d(EI)}{dt} = k_1(E_f)\,(I_f) - k_2(EI),$$

$$\frac{di}{dt} = k_1(I_t)\,(1 - i) - k_2\, i.$$

For I_t we now substitute its equilibrium value and simplify, to give

$$\frac{di}{dt} = k_2 \left(\frac{1}{1 - i_e}\right)\left(i_e - i\right). \qquad \text{(Equation 1)}$$

Integrating to obtain i as a function of t,

$$i = i_e \left\{1 - e^{-\frac{k_2 t}{1 - i_e}}\right\}. \qquad \text{(Equation 2)}$$

It follows from *Equations 1* and *2* that, under the conditions described, the course of development of a given degree of inhibition with various inhibitors acting on the same or different enzymes is a function of k_2, the velocity constant of *dissociation*. The particular values of the forward velocity constant, the MICHAELIS constant (or inhibitor concentration), and the enzyme concentration are of no importance. If the rates of combination of a number of inhibitors with the same enzyme are considered, and if the enzyme concentration is not varied, then k_2 determines the *absolute molar reaction rate* $[d(EI)/dt]$ since any given degree of inhibition always reflects the same number of combined inhibitor molecules. If different concentrations of the same or different enzymes are allowed, then k_2 no longer determines the absolute reaction rate, but it still determines the *rate of attaining equilibrium* (di/dt). In the special case that 50% inhibition is being approached at equilibrium, the *initial* rate of development of inhibition is simply equal to k_2.

Figure 1 shows *Equation 2* plotted for four values of k_2, when 50% inhibition is being approached at equilibrium. This kind of curve, obtained experimentally, would give k_2 directly even though no other information about the system were available[2]. It would only have to be shown that most of the inhibitor was free at equilibrium, which might be done either through a direct experimental approach or by measuring the slope of the equilibrium log concentration-inhibition curve, as de-

[1] A. GOLDSTEIN, Arch. Biochem. Biophys. *34*, 169 (1951).

[2] L. H. EASSON and E. STEDMAN, Proc. Roy. Soc. London [B] *121*, 142 (1936).

[1] O. H. STRAUS and A. GOLDSTEIN, J. Gen. Physiol. *26*, 559 (1943).

[2] In studying a new system one would first find a suitable inhibitor concentration, one that will produce a moderate degree of inhibition at equilibrium. Using this concentration, the time course would next be plotted, as in Figure 1. A simple procedure then would be to measure the time required to reach half of the equilibrium value and substitute this into the expression $k_2 = 0{\cdot}69\,(1 - i_e)\,/\,t$, derived from Equation 2.

scribed elsewhere[1]. In this way one might, at least in principle, determine the velocity constant of dissociation in a reaction between two unidentified components without knowing the concentration of either.

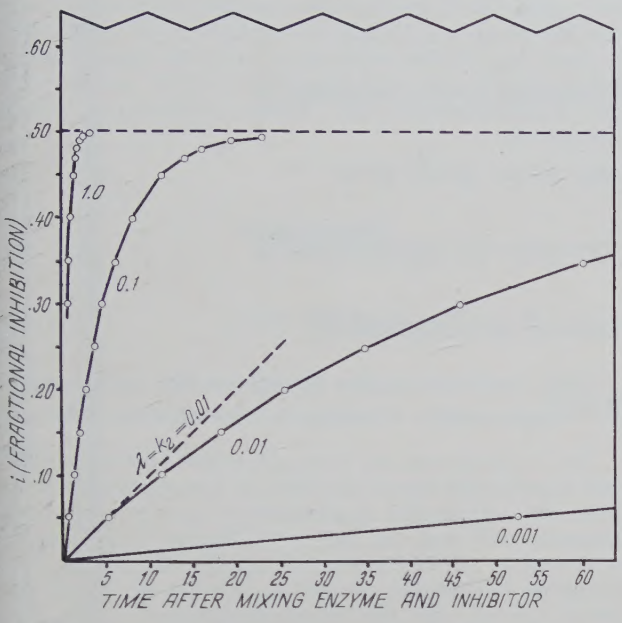


Fig. 1.–*The course of development of 50% inhibition, for different values of* k_2. The curves are plotted according to Equation 2. The value of k_2 is indicated next to each curve. The dimension of k_2 is $time^{-1}$ and its units are the same as those of the time scale. The broken line marked λ shows the initial slope of a curve, which is equal to k_2.

The foregoing conclusions may sound absurd because they seem to contradict the obvious fact that the rate of any reaction is determined by the concentrations of the reacting substances and by *both* (forward and reverse) velocity constants. So here, of course, the velocity of combination is determined by the product $k_1 \cdot I_t \cdot E_f$ as well as by k_2 (EI). But introducing $\boldsymbol{i}$ as a measure of the *fractional* inhibition has the effect of removing E_f and (EI), while the requirement that the same value of $\boldsymbol{i}$ be attained at equilibrium in all cases fixes the concentration I_t in such a way that the product $k_1 \cdot I_t$ always bears the same proportionality to k_2. Thus for a series of inhibitors with the same k_2, while the product $k_1 \cdot I_t$ always remains the same, k_1 and I_t individually may vary reciprocally without influencing the forward reaction velocity. On the other hand, if k_2 changes, the product $k_1 \cdot I_t$ must also change, resulting in a new forward reaction rate.

The mechanical analogy depicted in *Figure 2* may help explain why a forward reaction rate should depend upon a reverse velocity constant. Water is to be run into an empty tub at a constant rate from a reservoir so large that its water level does not fall when the tub fills. The inflow rate can be varied by changing either the reservoir level or the size of the inflow tap, or both. A steady state is ultimately to be reached, with the tub exactly filled to a certain pre-arranged level (e.g. half full). The inflow tap may not be tampered with after having once been opened to the desired degree. What determines the rate of filling of the tub?

[1] O. H. Straus and A. Goldstein, J. Gen. Physiol. *26*, 559 (1943). – A. Goldstein, J. Gen. Physiol. *27*, 529 (1944).

Obviously, an outlet from the tub is essential, for otherwise the water would ultimately overflow no matter how slow the inflow rate. If a *very small* outlet is provided, the requirements of the problem can be met, but only in one way—by running the water in *very slowly*. Of course, the inflow rate from the start must always be exactly the same as the outflow rate at the steady state; and the latter will depend entirely upon the size of the outlet, if the tub is always to be filled to the same level. If the outlet is enlarged the inflow rate can be increased correspondingly and the tub will fill more quickly. The rate of filling is thus always determined by the outlet size, and since the inflow rate can be adjusted by altering either or both of two factors (reservoir level, inflow tap), neither of these *alone* has any bearing on the result.

Now let us suppose that the tub is supplied with outlet and inflow taps that are *both* fixed, so that only the reservoir level can be varied. The analogy is now complete, for both the rate-determining constants are fixed characteristics of the system just as are k_1 and k_2 for a given enzyme-inhibitor pair. The mechanical problem can still be solved by selecting the right reservoir level, and this maneuver corresponds exactly with varying I_t to discover the concentration needed to produce a desired degree of inhibition at equilibrium. As before, the outlet size governs the rate of filling by determining the required inflow rate, and one is forced to choose that single reservoir level which will yield this inflow rate. In a series of such mechanical systems, all tubs with the same outlet size will fill (to the same degree) at the same rate, regardless of the size of their inflow taps. All tubs with inflow taps of the same size (or whose reservoir levels are the same) will fill at different and unpredictable rates, unless their outlets happen to be the same. Therefore in all tubs, the rate of filling (to the same degree) will always be predictable from the outlet size alone, and will be slower, the smaller the outlet.

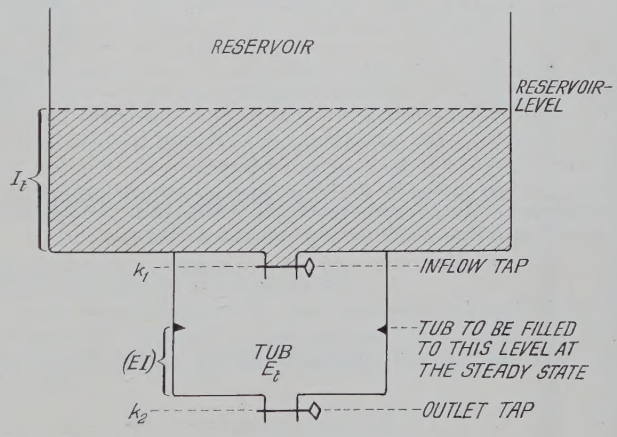


Fig. 2.–*Mechanical analogy to rate of development of inhibition.* For explanation see text.

It is of some interest to consider the physical meaning of k_2, upon which the rate of development of inhibition depends. This constant expresses the tendency of the enzyme-inhibitor complex to dissociate. It is therefore necessarily a measure of intrinsic stability of the complex, i.e. of the tightness with which inhibitor molecules are bound to enzyme. In thermodynamic usage it has been customary to define bond strength in terms of the free energy change described by the equilibrium constant ($\Delta F = -RT \ln K$), i.e. to equate *tightness of binding* with *affinity*. It must be noted, however, that while

the equilibrium constant defines the overall tendency to form a complex (the resultant of associating and dissociating tendencies), it gives no information about how tightly or loosely the inhibitor molecules are bound. It is the property measured by k_2 that has to do with the strength of the intermolecular forces holding inhibitor molecules at the enzyme surface, and this may vary quite independently of the affinity.

Consider aliquots of an enzyme solution in two vessels containing, respectively, inhibitors X and Y. If both inhibitors have the same affinity for the enzyme, and if their concentrations in the two vessels are the same, then the two enzyme solutions will be inhibited to the same degree when equilibrium is reached. But this tells us nothing about the relative tendencies of EX and EY to dissociate. X, for example, might combine very readily (e.g. by virtue of a high proportion of effective collisions = large k_1) and form a loose complex (= large k_2) so that at equilibrium the molecules of X would be associating with and dissociating from the enzyme with great frequency. Y, on the other hand, might combine only slowly (e.g. because of steric hindrance = small k_1) yet form an extremely tight complex (= small k_2) so that at equilibrium the frequency of association and dissociation would be much lower.

It was established earlier that the rate of approach to equilibrium is directly determined by k_2, and it has now been pointed out that k_2 is a measure of the tightness of the enzyme-inhibitor bond (in the sense defined above). It therefore follows that if a series of inhibitors is under study, those that are bound most tightly to enzyme (i.e. those with smallest values of k_2) will not only dissociate *but also associate* most slowly. In general, for the type of system considered here, the tighter the enzyme-inhibitor bond, the more slowly will inhibition develop. Conversely, an unusually slow development of inhibition indicates the formation of a very tight complex[1].

Since this paper was submitted for publication, Myers[2] has elaborated a theoretical approach to the kinetics of systems where inhibition is brought about by competitive substrates with very low turnover rates. In such cases, which may be more common than formerly supposed, k_2 might be negligibly small, the reaction being represented by the equation $E + I \underset{k_1}{\rightarrow} EI \underset{k_5}{\rightarrow} E +$ products. Despite the different reaction mechanism, the foregoing analysis should remain valid, except that the rate-determining role will now be played by k_5 instead of k_2. In this situation the rate of attainment of equilibrium will still depend upon the "dissociation" rate of EI, which is equivalent to the rate of destruction of inhibitor.

Avram Goldstein

Department of Pharmacology, Harvard Medical School, Boston, Mass., and Pharmacological Institute, University of Bern, Switzerland, March 31, 1952.

Zusammenfassung

Bei gewissen reversiblen Reaktionen wird, unter bestimmten, stark eingeschränkten, aber doch häufig vorkommenden Bedingungen, die Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung für die *Hin*-Reaktion nur durch die Geschwindigkeitskonstante der *Rück*-Reaktion bestimmt. Diese besondere Anwendung des Massenwirkungsgesetzes wird an der Hemmungsentwicklung in gewissen Enzym-Inhibitor-Systemen illustriert.

In einem reversiblen Enzym-Inhibitor-System, in dem der grössere Teil der Inhibitormoleküle frei bleibt, erfolgt die Einstellung eines gegebenen Hemmungsgrades um so langsamer, je fester das Inhibitormolekül im entstehenden Komplex gebunden ist. Kann der Hemmungsgrad gegen die Zeit aufgetragen werden (vom Augenblick der Mischung von Enzym und Inhibitor an gerechnet), so lässt sich aus der erhaltenen Kurve die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation berechnen, selbst wenn die Konzentrationen der Reaktionsteilnehmer unbekannt sind.

[1] It should be emphasized again that these conclusions do not apply to the case where most inhibitor molecules are combined at equilibrium (apparent stoichiometric reversible combination) or to irreversible inhibition.

[2] D. K. Myers, Biochem. J. (in press, 1952).

Congressus

SCHWEDEN

XIII. Internationaler Kongress für reine und angewandte Chemie in Stockholm, 1953

Die 17. Konferenz der Internationalen Union für reine und angewandte Chemie und der 13. Internationale Kongress der reinen und angewandten Chemie werden im Sommer 1953 vom 29. Juli bis 4. August in Stockholm und vom 5. bis 7. August in Uppsala stattfinden. Der Kongress beschränkt sich auf das Gebiet der physikalischen Chemie mit den Unterabteilungen: Chemische Thermodynamik und Thermochemie, Elektrochemie, Oberflächen- und Kolloidchemie, Reaktionskinetik und andere Gebiete der physikalischen Chemie. Ferner wird ein Symposion über Holzchemie arrangiert mit den Untergruppen: Strukturchemie der Holzbestandteile, Chemie der Zellulose und der Hemizellulose, Ligninchemie. Unmittelbar nach dem Hauptkongress in Stockholm wird in Uppsala ein Symposion der makromolekularen Chemie abgehalten.

Constructiones

TSCHECHOSLOWAKEI

Neues hydrobiologisches Institut in Sedlice

Am 31. Mai 1952 wurde in Sedlice bei Blatná ein hydrobiologisches Institut eröffnet, welches unter der Leitung von Dr. Rudolf Šrámek-Hušek steht. Assistent ist Dr. Jiří Růžička. Das Institut verfügt über biologische und chemische Laboratorien, eine grosse Bibliothek, Photoräume und Aquarienanlagen. Das Arbeitsprogramm betrifft – entsprechend der Lage des Institutes in ausgedehnten See- und Teichgebieten – regionale Limnologie, insbesondere Vergleiche verschiedener Teichbiocönosen und Studium einiger praktischer Organismengruppen (Infusorien, Cladoceren, Copepoden, Desmidiaceen). Die 1925 von Prof. K. Schäferna† gegründete Hydrobiologische Station an den Lnáře-Teichen liegt 12 km vom neuen Institut entfernt und steht mit diesem als Feldstation in Verbindung. Die Adresse der neuen Station lautet: Hydrobiologisches Institut der Akademie, Sedlice bei Blatná, Československo.

O. Jírovec

Unsere medizinischen Spezialpräparate werden von unserer Forschungsabteilung in enger Zusammenarbeit mit führenden Instituten und Kliniken entwickelt.

Die Präparate unter der Marke

CILAG

werden von den Aerzten wegen ihrer stets gleichbleibenden hohen Qualität und Zuverlässigkeit allgemein geschätzt.

CILAG AKTIENGESELLSCHAFT SCHAFFHAUSEN

BIOLOGICAL ABSTRACTS

A cooperative undertaking by biologists themselves to provide a means for keeping abreast of the rapidly growing and increasingly diversified literature in all fields of biology.

No individual possibly could read the thousands of journals containing significant contributions to the biological sciences. It is well known that much needless effort has been expended on problems that already had been solved. That is why a comprehensive abstracting and indexing service is so necessary both in research and in teaching.

Biological Abstracts covers all the important journals in the United States and many throughout the entire world. Publishing close to 40,000 abstracts annually, it affords the only means by which biologists can keep posted on the work of others in all fields of biology. The annual subscription price of $50.00 (U. S. funds) is low because more than 3,000 biologists contribute their services for little or no remuneration.

Biological Abstracts also is published in nine low-priced sectional editions specially designed for individuals who are interested only in one or more closely related fields.

The Back Volumes from Volume I (1927) to date still are available.

Write for complete information

BIOLOGICAL ABSTRACTS

UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA PHILADELPHIA 4, PA., U.S.A.

Leben und Umwelt

Naturwissenschaftliche Monatsschrift mit Aufsätzen aus dem Gebiete der Biologie, Medizin, Technik, Geologie und Länderkunde, allgemeinverständlich, aber wissenschaftlich einwandfrei geschrieben.
Herausgegeben von der Vereinigung Schweizerischer Naturwissenschaftslehrer.
Redaktion:
Dr. L. Jecklin, Basel (Gesamtleitung); Dr. A. Gerber, Basel; PD. Dr. H. Annaheim, Basel

12 Hefte im Jahr für nur Fr. 5.20

Aus dem Inhalt der letzten Nummern:

Prof. Dr. A. U. Däniker: Die Inseln von Brissago und ihre Bedeutung für die «Akklimatisation» fremdländischer Pflanzen; J. C. Thams: Eine interessante mikroklimatische Beobachtung; Dr. J. Schlittler: Der Hausschwamm, eine Gefahr unserer Wohnungen; Peter Bopp: Die psychologischen Grundlagen einer Einteilung der Tiere nach ihren Lebensgebieten; Dr. F. Hodler: Gefiederte Wintergäste auf der Aare bei Olten; A. Schneider: Unterirdische Kohlenvergasung; Dr. Robert Wildhaber: Bäuerlicher Lawinenschutz in Vergangenheit und Gegenwart; Dr. med. W. Voellmy: Prinzip und Anwendungsgebiete des Elektrokardiogrammes; John Haller: Erlebnisse im Reiche des Nanok; Dr. H. Wirz: Pflanzenschutz in der Schweiz; Dr. Gertrud Bussmann: Herbstfarben; W. Ess: Flussmäander; Dr. A. Böhni: Das Tagpfauenauge; W. Jucker: Ein Föhnsturm, im Fluge erlebt; Urs Deffner: Ein süsser Jubilar – 150 Jahre Rübenzucker; J. Frei: Brennt der Rheinfall?; August Schwander: Pflanze oder Tier?; Dr. Paul Wirz: Papierfabrikation in China; Dr. Robert Stäger: Die Anpassungsfähigkeit von Krabbenspinnen an Blütenfarben.

Verlangen Sie bitte ein Gratisprobeheft beim

VERLAG H. R. SAUERLÄNDER & CO., AARAU